VERZAMELDE GESCHRIFTEN

VAN

M. W. BEIJERINCK

TER GELEGENHEID VAN ZIJN
70STEN VERJAARDAG

MET MEDEWERKING DER NEDERLANDSCHE
REGEERING UITGEGEVEN DOOR ZIJNE
VRIENDEN EN VEREERDERS

VIERDE DEEL

DELFT / MDCCCCXXI



MBL/WHOI
0 0301 0013282 5

VERZAMELDE GESCHRIFTEN VAN M. W. BEIJERINCK

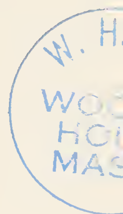
VERZAMELDE GESCHRIFTEN

VAN

M. W. BEIJERINCK

TER GELEGENHEID VAN ZIJN
70STEN VERJAARDAG

MET MEDEWERKING DER NEDERLANDSCHE
REGEERING UITGEGEVEN DOOR ZIJNE
VRIENDEN EN VEREERDERS

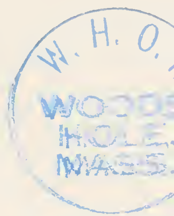


VIERDE DEEL

DELFT / MDCCCCXXI

Impr.: F. Bruckmann A.G. und J. B. Obernetter, München

VIERDE DEEL



Inhoud van het Vierde Deel.

Further researches on the Formation of Indigo from the Woad (Isatis tinctoria).

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. III, 1900, p. 101—116. — Verscheen onder den titel »Verdere onzoekingen over de indigo-vorming uit Weede *(Isatis tinctoria)*« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel IX, 1900, blz. 74—90.

Since my first communication on the chromogene of the woad[1]) I have found that the indoxyl does not exist in it in a free condition, as I then thought, but in a loose compound which I will call isatan, and which, by an enzyme, simultaneously present, the isatase, is easily decomposed with production of indoxyl.

1. The research of Schunck.

As soon as I had come to this conclusion, the question arose, whether the matter prepared by Schunck from the woad in 1855, and described[2]) under the name of »indican«, can be either or not identic with isatan. That in many of his experiments he has indeed had isatan before him I consider as certain. But in carefully reading his essay I met with number of contradictions, which are only to be explained by Schunck's working with two other substances besides, which he continually interchanges with each other and with isatan; these are indoxyl and a chromogene which colours intensely yellow by alkalies, occurs abundantly in the woad, precipitates, just like isatan, with basic lead acetate, but has nothing to do with indigo. If I well understand him he calls this substance »changed indican« and considers that it differs from it by containing one or two H^2O more, but this is a wholly unproved hypothesis.

Indoxyl was not known to Schunck at all, but his second preparation method of the »indican« reposes on ether extraction of the dried plant. As isatan is not soluble in ether I suppose that during the preparation small quantities of indoxyl originated from the isatan, which easily occurs under various influences, and for which ether is an excellent solvent.

However strange it may be, it was the matter colouring yellow by alkalies, and not the indigo-chromogene itself, which Schunck subjected to the three analyses on which reposes the well-known formula of the »woad-indican«. Quite

[1]) On the Formation of Indigo from the Woad *(Isatis tinctoria)*. Kon. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam; Proceedings of the Meeting of 30th September 1899.

[2]) E. Schunck. On the Formation of Indigo-blue. Part I. Philosophical Magazine (4) Vol. 10, pag. 74, 1855. For the indiglucine: Ibid. Vol. 15, pag. 127, 1858.

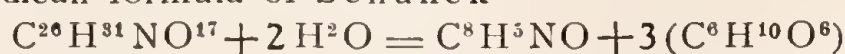
clear he is not, but so far as I conceive his meaning, the first and the third preparations, which he analyzed, contain no indican at all, yet he calls them the purest; the second he considers as less pure, and he seems to have subjected it to the analysis after having convinced himself that by precipitating it with alcohol, lead acetate and ammonia »it contained no longer unchanged indican«, which consequently means, that he had before him the said matter turning yellow by alkalies and thus containing no more indigo chromogene.

Word for word he says the following, first concerning his analyses in general (l. c. Part I, pag. 89): »I have hitherto been unable, I regret to say, to ascertain the exact composition of indican by direct experiment. On account of the deliquescent nature, and its so readily undergoing change when heated, it was impossible to subject it to analysis in a free state and I was therefore obliged to have recourse to the lead-compound.« Then follows the description of the three analyses themselves. Of the first he says (l. c. pag. 90): »Notwithstanding the care, however, which I took in the preparation of the specimen, I found that it did not contain unchanged indican, as a little of it, when tested with sulphuric acid, gave no indigo-blue. It is nevertheless the purest specimen of the lead-compound which I have analysed.« Then he says of the second and third: »The next analysis which I shall give, places in a striking light the effect which alkalies exert on indican. I took some of the same solution of indican which I had employed for the preceding analysis, and which I found to give, when a little of it was boiled with acid, very pure indigo-blue; but instead of evaporating it, I added a large quantity of alcohol to it, and then precipitated with acetate of lead and ammonia. The precipitate no longer contained unchanged indican« ... »The third analysis was performed with a lead-compound made in the same way as that of the first analysis [1]).«

All this is not quite clear, but I read from it that these analyses have nothing to do with the indigo chromogene itself, that is to say, with isatan, and I think that they relate to a mixture of the chromogene from the woad, which colours yellow by alkalies, and plantslime (»indiglucine«). The explanation of this enormous fact should, I think, be sought in the following circumstances. Schunck prepared the »indican« by alcohol extraction from carefully dried woad-leaves, which in itself is quite rational, because in this way relatively concentrated and rather pure solutions are obtained. But if the dried leaves are kept a little too long, for instance two days at 28° to 30° C., or if they grow a little moisty, the isatan vanishes completely from them. Though Schunck evidently knew that the chromogene can easily disappear from the dry leaves, he does not mention the

---

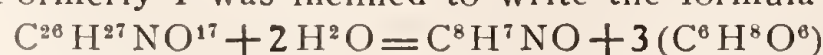
[1]) Three analyses of such doubtful substances are the sole foundation upon which the well-known indican formula of Schunck



$$C^{26}H^{31}NO^{17} + 2H^{2}O = C^{8}H^{5}NO + 3(C^{6}H^{10}O^{6})$$

Indican — Indigo-blue — Indiglucine

is based and which, since 1855, has been accepted, without criticism, in all great chemical manuals. Formerly I was inclined to write the formula thus:



$$C^{26}H^{27}NO^{17} + 2H^{2}O = C^{8}H^{7}NO + 3(C^{6}H^{8}O^{6})$$

Indoxyl — Glukoron

but now, having carefully studied Schunck's essay, I think this interpretation also worthless.

short time after which this occurs already, so that I think it very well possible that the chromogene has disappeared during his preparation without his having observed it. For it is to be kept in view that his method of demonstrating the indigo-blue qualitatively is highly deficient and consisted in decomposing the chromogene by »strong mineral acids«, the very worst method to be followed, as strong acids are pernicious as well to isatan as to indoxyl.

My opinion that Schunck at the moments when it was particularly important, had not to do with the indigo chromogene itself, but with another substance, is also based on several observations which he makes about the properties of the »pure indican«. So we read on pag. 85 (l. c. Part I): »With caustic alkalies, baryta and lime-water the watery solution turns of a bright yellow.« This reaction holds only good for the impurity which remains in the dried leaves after the isatan is destroyed in them. If in the preparations any isatan had been present the yellow colouring would have been immediately followed by the formation of indigo-blue, which then becomes much more distinctly visible than if the same preparation is decomposed by acids. Evidently he has examined different samples with acids and alkalies, and samples, free from isatan, only with the latter, else he would certainly have found that those preparations, which by acids produce indigo-blue, yield much more indigo if they are treated with an alkali. Likewise the following statement of his preliminary researches is for the greater part unintelligible if it is admitted that Schunck speaks of isatan. He says (l. c. pag. 81): »I was enabled to infer, with positive certainty, that the *Isatis tinctoria* contains a substance easily soluble in heat and cold water, alcohol and ether, which, by the action of strong mineral acids, yields indigo-blue; that the formation of the colouring matter from it can be effected without the intervention of oxygen or of alkalies; and that the latter, indeed, if allowed to act on it before the application of acid, entirely prevent the formation of colouring matter.« In opposition to this, the fact must be stated, that the best method for demonstrating with certainty and quickness isatan or indoxyl in woad-sap, just consists in adding alkali to it, by which the isatan is decomposed and the indoxyl is quickly oxidized to indigo at the air; after this, the addition of acid may be desirable to decolour the yellow pigment formed by the alkali, by which the indigo-blue appears with greater purity.

The uncertainty of the whole research explains how it is possible, that Schunck, when later becoming acquainted[1]) with *Polygonum tinctorium*, could think that the indican therein occurring, the composition of which, $C^{14} H^{17} NO^{6} + 3 H^{2} O$, has recently been determined by Messrs. Hoogewerff and ter Meulen[2]), and which is entirely different from isatan, could be identic with his »woad-indican«.

Consequently I believe that Schunck cannot be considered as the discoverer of the isatan, though it is not to be doubted, that in his experiments, he has sometimes had this substance before him, and, basing on the above exposition I take his indican formula for not appliable to isatan.

---

[1]) On Indigo-blue from *Polygonum tinctorium*. The Chemical News. Vol. 39, pag. 119, 1879.

[2]) Kon. Akad. van Wetensch. te Amsterdam, 31 Maart 1900, pag. 598.

2. Preparation and properties of isatan.

Indoxyl and isatan are very unstable and still at present most imperfectly known substances, which only in acid solutions can easily be distinguished from each other, in neutral solutions, without the use of of isatase, with much more trouble, in alkaline solutions not at all, because in these isatan produces indoxyl.

The reason why at first I thought that the woad must contain free indoxyl and no compound of it, is the fact that in the extracts obtained from young woad-leaves, rich in isatan, as well by decoction as by cold extraction, the isatan is decomposed and an indoxyl solution is obtained. Now I admitted in the beginning, that if in the woad, as was my leading theory, a glucoside was present, which, in analogy to the indican, must be decomposed by an enzyme, at the decoction no indoxyl but exclusively this glucoside would be obtained, because by boiling the enzyme is suddenly destroyed. In this view I was supported by the fact, that this indeed takes place with *Indigofera* and *Polygonum*, which by decoction yield indican, by cold extraction indoxyl.

But I began to doubt of the generality of this theory, when observing, that *Phajus grandiflorus*, which belongs to the indican plants, nevertheless[1]) produces indoxyl at decoction. So this seemed also possible with the woad, though it was clear, that the properties of the »glucoside« ought in this case to be quite different from those of indican.

But I was only put on the right way, by the experience, that it is possible to obtain from the leaves of the woad, by the extraction with dilute acids a solution, which remains unchanged at the air, although it yields with alkalies much indigo-blue, while an equally acid indoxyl solution slowly oxidizes at the air to indigo. I then clearly saw why I had before obtained indoxyl from the woad. My experiments had been performed on a small scale; I had been able with care to select growing leaves and buds only; but they contain much isatan and so little acid, that the enzyme isatase can become active, so that by decoction, as well as by cold extraction with water, and even with alcohol, the produce indoxyl, though at the decoction and alcohol extraction mixed with much isatan, which fact I only observed later. If I had used older leaves which contain more acid, I should have found at once isatan quite free from indoxyl.

The relative constancy of isatan in feebly acid solutions, even at boiling temperature can be utilized for its preparation.

Though the acidity during the extracting must befeeble yet it must be strong enough to prevent the decomposition of the isatan by the isatase. To this end an acidity of 1.6 to 3.2 cc. of normal oxalic acid per 100 cc. of the extraction liquid, (0.1 to 0.2 weight percentage) suffices, for the acidity of the older leaves themselves amounts to about 1,5 cc. normal per 100 cc. of the juice, and this is the very limit of acidity above which the isatan becomes inactive. If the extraction is effected by boiling, this degree of acidity should be exactly observed. In cold extraction, with oxalic acid, the isatan is much less subject to decomposition, so that, below 50° C. solutions of 1 to 3 pCt. oxalic acid can safely be employed.

---

[1]) Indigofermentation. Kon. Akad. van Wetensch., Amsterdam, Proceedings of the Meeting of Maart 1900, pag. 573.

But at these low temperatures the acid penetrates with less rapidity into the cells, in which accordingly the enzyme can become more or less active producing some indoxyl. Hence, in the acid extraction at low temperature, it is advisable to rub the leaves down in a mortar, immersed in the acid liquid.

In particular at boiling temperature and when using an extraction liquid of an acidity of 2 to 3 cc. of normal oxalic acid, it is easy to obtain a quite undecomposed isatan solution from the growing woad-leaves, even of the youngest still neutrally reacting meristemes. In consequence of the boiling temperature, aided by the perfect surrounding of the cells with the dilute acid, the isatase is destroyed simultaneously with the dying of the protoplasm, by which decomposition of isatan is quite excluded. As the extraction continues, there is an interchange between the feabler acidity within (0.5 cc. normal pCt.), and the stronger acidity without the young cell, and at the end of the experiment, a solution of isatan of 0.5 to 2 cc. of normal acid per 100 cc. of juice in obtained, when the weight of the leaves used, equals that of the extraction liquid.

More acid used in the boiling than the said percentage causes isatan decomposition, by which not only indoxyl but also brown products of decomposition originate.

Oxalic acid can be replaced by other acids and by acid salts. Thus I obtained good results with dilute sulphuric acid and phosphoric acid, and with a saturated solution of boric acid, at room temperature. Acetic acid causes a feebler decomposition than oxalic acid. When the appearance of brown products of decomposition during the boiling is taken as a criterion for the decomposition, I found that 12 cc. of normal acetic acid added to 100 cc. of juice (ca. 0.8 weight percentage), is about proportioned to 5 cc. of normal oxalic acid (= 0.3 weight percentage). Acid salts act like acids. Kaliumbioxalate and biphosphate can only be used in strongly diluted solutions. With a cold saturated solution of kalium bitartrate the extracting may be operated at boiling temperature without decomposition; only by prolonged boiling a little indigo-blue is produced. I prefer, however, the extraction with oxalic acid. Therewith the solutions remain clear and of a light yellow and can very easily be filtered[1]); after filtering, the remaining leaf-matter is soft, but by no means slimy, and can quite well be pressed dry, so that, in consequence of the high water percentage of the leaves, a quantity of extract is obtained nearly twice as much as the original volume of the oxalic-acid solution.

If with the thus obtained isatan solution enzyme experiments are to be performed, the acid must be removed, which is best done by boiling with chalk[2]). As the reaction of the chalk is slightly alkaline it should be very finely divided, as larger particles form a little indigo on their surface. After filtering off the oxalate and the superfluous chalk, a liquid results somewhat brownisch indeed, but not so much as to be hurtful to the enzyme experiments.

This liquid cannot be evaporated to dryness without being decomposed, even not at room temperature, because during the concentration the acidity increases. To neutralize the syrupic matter is troublesome.

---

[1]) If the woad-leaves are boiled with more acid than 2 to 3 cc. normal per 100 cc. of the juice, the decoction grows slimy and gives trouble in filtering.

[2]) Neutralizing without endangering the subsequent enzyme action, can also be done with lead-, mangan-, magnesia-, or baryta-carbonate, but I prefer chalk.

The extraction of the isatan can also be effected with feebly acid alcohol, both in the cold and at boiling temperature. Fresh leaves are then to be prefered to dried ones, because in drying there always gets lost some, at last all isatan. The alcohol extract must be evaporated at low temperature and finally be neutralized with chalk. After boiling a brownish, almost neutral and very rich isatan solution is obtained, which can be purified with neutral lead acetate.

For further concentration the isatan can be precipitated with basic lead acetate, and the yellow precipitate be decomposed in the cold with oxalic acid. The lead oxalate separates freely from the isatan solution, and the excess of oxalic acid can be removed with chalk, the lead with sulphurated hydrogen. This solution can be kept without decomposition for some time, but after a few weeks the isatan vanishes.

In the decoction method with oxalic acid, followed by lead precipitation, the chlorophyll is removed from the very first and evaporation is excluded. More plant slime will then precipitate with the lead than by alcohol extraction, but on further purifying, this slime can be precipitated with ether-alcohol. I have as yet not been able to prepare dry isatan, as a powder, from these extracts, such as I before prepared the indican.

The most characteristic difference between indican and isatan consists in their behaviour to alkalies: indican is constant in concentraded alkaline solutions, isatan is decomposed by very feeble alkalies, even in the cold. Concentrated solutions of dinatrium phosphate, phosphoric salt and ammonium carbonate produce indoxyl from isatan, already at room temperature. By acids, both indican and isatan are decomposed, but indican with much more difficulty, which is especially evident when using acid salts. So, isatan is already decomposed by boiling with dilute kalium bioxalate, in which indican is constant.

Both substances precipitate with basic lead acetate, producing yellow precipitates, which colour is probably proper to the substances themselves, and not to impurities.

Isatase, the specific enzyme from woad, does not act on indican; isatan on the other hand is not decomposed by the indigo-enzymes.

Isatan is not directly splitted by the common microbes; indirectly it may, of course, be decomposed by the alkali produced by microbes. Indican, on the other hand, as I have formerly shown, is directly decomposed by many microbes, either by ferment action of the protoplasm (katabolism), or by specific enzymes, proper to the microbes. This difference between isatan and indican is probably related to the nature of the substances set free in the decomposition beside the indoxyl. So the glucose, from the indican, is an excellent nutrient for many bacteria, whilst the very stability of the isatan in relation to microbes, seems to indicate that the matter, which besides indoxyl originates from it, is no glucose, perhaps no sugar at all.

3. The isatase.

The preparation of the woad-enzyme is effected in the same way as that of the indigo-enzymes. The related parts of the plant are rubbed down in living state under alcohol, and the alcohol is so often renewed until all the chlorophyll

pigment is removed. After filtering and drying the crude isatase is obtained as a white, feebly acid powder in which, of course, all substances not soluble in alcohol are present, hence, all the other enzymes of the woad too. As the enzyme is quite insoluble in water it can be purified by extraction with destilled water, by which the other enzymes, at least those that are soluble, disappear. Solvents for the isatase itself I have not yet found.

As the woad, like the cabbages, is very rich in gypsum, the crude isatase contains so much of it that to remove it with destilled water is troublesome. I have therefore, in order to answer the question, whether in the action of isatase on isatan perhaps a sulphate is produced, as in the splitting of kalium myronate by myrosine, prepared in the following way isatase free from gypsum. Woad leaves cut fine were rubbed down in destilled water, then pressed out, and the remaining matter extracted with water until the filtrate proved free from sulphuric acid. Then the chlorophyll pigment was removed by alcohol and the remaining matter dried and powdered.

Though the thus obtained preparation is poor in enzyme, because this is localized in the chlorophyll granules, which during the pressing of the leaves are for the greater part also pressed out, it is still sufficient to bring about a strong isatan decomposition. As was to be expected, sulphates were not thereby set free.

The isatase is spread through the whole woad-plant; it occurs as well in the growing parts as in full-grown roots, stemps, leaves, and flowers. So the distribution is another than that of the isatan, which is wanting in all full-grown parts, and is the more accumulated in growing roots, stems, and leaves, the younger they are. Another distribution also than that of the indigo-enzymes in the indican plants, which are only found in the parts rich in indican.

On the other hand the distribution of the isatase within the cell itself, corresponds with that of the indigo-enzymes: both are localized in the chromatophores. The isatan has also, in the cell, a localisation corresponding with that of the indican, for in as much as can be inferred from micro-chemical experiments, both are found in the living protoplasm of epidermis, mesophyll and other parenchymatous tissues. For establishing the localisation of isatan and isatase in the cell, the same way can be followed which I formerly pointed out for detecting the indican and the indigo enzymes[1]).

As regards the isatan, for this end, not too thin microscopic sections of young, vigorously growing stems or leaves are put in a boiling mixture of hydrochloric acid and isatine; by the acid indoxyl is separated, which produces, with the isatine, red crystal needles of indigo-red, localized in the protoplasm. More difficult to observe, but still, I think, quite convincing is the precipitation of indigo-blue, as small granules, in the living protoplasm, when the sections, in a living state, are put in a mixture of boiling hydrochloric acid and ferrichlorid. Remarkable is the strong accumulation of isatan in the epidermis cells, and especially in the hairs found on the young leaves.

The localisation of isatase in the chromatophores can be demonstrated in two ways. Either little bits of the easily loosening epidermis of woad-leaves, or

---

[1]) Indigofermentation p. 579.

microscopic sections of stems or leaves, all in a living state, can be put in a neutrally reacting woad-decoction, rich in isatan, and heated to ca. 45° C. After some minutes already the chromatophores begin to colour blue; the intensity of colour increases some time, to reach its limit in an hour or so.

The blue-colouring of the colourless chromatophores of epidermis and stem-pith, is here distinctly to be observed, so that, particularly the fragments of the first, become very interesting preparations.

The localisation of the isatan in the protoplasm, of the isatase in the chromatophores, renders their inter-action in the living cell possible without any influence of the acid cell-sap. At the death of the cell, this state will suddenly change and the acidity of the cell-sap determines wheter the isatase can act or not on the isatan.

In no other plant but the woad I have hitherto been able to detect isatan. I had expected its presence in some short-valved Cruciferae. So in *Capsella bursa pastoris*, where, in case the root-neck is much hurt, a trace of indoxyl can be pointed out, but here also the enzyme is wanting. Likewise it wants in the indican plants. Also all microbes examined are devoid of isatase.

4. Action of isatase on isatan.

The action of isatase on isatan is, as observed before, only possible in neutra or amphoteric and very feebly acid solutions. In alkaline solutions the observation becomes uncertain, because the alkali itself splits off indoxyl. If the acidity amounts to 1.5 cc. of normal acid per 100 cc. of the isatan solution, the action is much weakened, and at ca. 1.8 cc. of normal acid, there is no more decomposition of isatan at all, which is noteworthy as this percentage of acidity is reached in the cell-sap of older woad-leaves. This does not however exclude isatan-decomposition by the enzyme in the living cell, as the process can be limited to the protoplasm, in accordance with the localisation described.

As the action of the isatan is judged after the formation of indigo-blue, two chemical processes are involved in it, isatan splitting and indoxyl-oxidation. If the experiment is performed with free access of air, for instance in a thin layer of the isatan solution, with the enzyme floating on it, the indoxyl changes directly into indigo; but if the isatan is decomposed with imperfect access of air, for instance, in the depth of an experiment tube, then it is necessary, during the experiment itself, to render the oxidation of the indoxyl as complete as possible by agitation with air, which does not however always succeed wih sufficient quickness, and so limits the accuracy of the experiment. Of course the liquid cannot be alkalized, because then not only the indoxyl formed by the isatase would become visible, but also the indoxyl set free by the alkali from the isatan not decomposed by the isatase. If the object is to observe the isatase action at a determined temperature, then the enzyme cannot be destroyed at the end of the experiment by heating, but this must be effected by some enzyme poison, as for instance sublimate.

Addition of acid to render the colour of the indigo-blue more pure must likewise be avoided, in order not to decompose isatan.

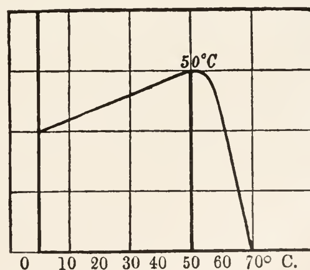
Accordingly it is necessary to perform the reaction in a very feebly acid solution, and to judge of the results without other precautions than a thorough aeration. I have not been able hitherto to answer the question after the nature of the matter, which at the isatan-splitting, most probably is set free beside the indoxyl. Pressed yeast, produces in woad-extract, heated with crude isatase at 30° C., more alcohol and carbonic acid, than in the same extract without isatase (in the proportion of 8:5), so that in the first there must certainly be formation of sugar capable of fermentation. But this sugar results, probably not from the isatan, but from the action of other enzymes, present in the crude isatase, on glucosides or carbohydrates, present in the isatan-solution, such as myrosine on myronates, and diastase on granulose.

The process of the decomposition cannot be studied with Fehling's cupric solution, as the isatan is decomposed by the alkali.

That to Schunck's »indiglucine« no value can be attached follows from § 1.

In order to state the influence of heating on the isatase action, the experiments were arranged as described elsewhere for the indigo-enzymes[1]), with the difference, that for the above reasons, alkalisation and subsequent acidification are here omitted. The were finely powdered enzyme is shaken in an experiment tube with the isatan solution, and in a water bath, at determined temperature, heated a determined number of minutes. There are always performed two experiments at the same time, so that a colorimetrical comparison of the produced indigo is possible, e. g. at 48° C. and 50° C., or at 40° und 60°, 45° and 55°, etc. The best results were obtained with dilute isatan-solutions, which are brought, as exactly as possible, to an acidity of 0.5 cc. normal per 100 cc. of liquid, and with so little enzyme, that the complete conversion was very slowly accomplished and took about half an hour.

The optimum for the action was found at 48° to 50° C., but could not be determined more accurately as differences of two 2° C. produce no distinct colorimetrical difference. At 70° C. the enzyme is completely destroyed. The minimumlimit is low, far below 0° C., as is seen in the figure. Noteworthy is the slowness with which the intensity of action decreases at decrease of temperature, and the quickness with which it takes place when the temperature rices. So the action at 10° and at 0° C. respectively is as strong as at 60° and 60.5° C.



Action of isatase on isatan.

On other substances but isatan isatase seems not to act; it has certainly no action on indican, neither could I decompose with isatase the potassium indoxylsulphate in horse urine.

When judging of these experiments it must be kept in view that other enzymes are present in the crude isatase, which may produce substances not indifferent for the isatase action. So mention was made above of the presence of the myrosine

---

[1]) Indigofermentation p. 586.

and diastase in the crude isatase preparations, and below I will refer to the presence of peroxydase.

5. Extraction of indoxyl from the woad-leaves.

Once acquainted with the chief properties of isatase and isatan, it is possible at will to extract isatan or indoxyl from the woad. Though in my former communication I spoke already of the indoxyl extraction, my being unacquainted with isatase prevented me from doing this with perfect clearness.

As alkalies produce indoxyl from isatan the extraction of woad-leaves therewith will at every temperature produce indoxyl. But by the presence of alkalies the indoxyl becomes so very oxidisable and then passes at the air so quickly into indigo, that the air, ever present in the leaves, causes a great portion of the indoxyl to get lost. On the other hand, neutral or feebly acid solutions oxidize much more slowly; it is true that also in these finally all the indoxyl passes into indigo, but such solutions keep unchanged for hours at room temperature and are fit for studying the properties of the indoxyl.

The chief point for obtaining such neutral or feebly acid indoxyl solutions from woad-leaves, is during the extraction to further the isatase-action, consequently to do the very thing which I formerly indicated as essential for the indoxyl extraction from indican plants, where all depends on the action of the indigo-enzymes. With woad this can best be effected by keeping the extraction temperature between 45^0 and 50^0 C., and by addition of chalk or of a salt of feebly alkaline reaction, partly to neutralize the acid of the leaves. Thus a good result is obtained by entirely filling a wide-mouthed stoppered bottle with young woad-leaves, and pouring over them a $^1/_2$ pCt. dinatrium-phosphate solution ($Na^2 H PO^4 + 12 H^2 O$), heated at about 50^0 C., removing the air as much as possible, closing the bottle and allow it to stand at 40^0 C. for 24 hours. By decantation and pressing the leaf matter, boiling and filtering, all the indoxyl is obtained in an amphoteric solution, which is somewhat brownish, but is excellent for indoxyl experiments. The presence or absence of undecomposed isatan is observed by precipitation with lead acetate, whereby the indoxyl remains dissolved. The indoxyl can also be shaken out with ether and in the remaining liquid sought with isatase for isatan. Not decomposed isatan remains also in the filtrate, when the indoxyl is allowed to oxidize at the air and the indigo-blue is filtered off.

The ether solution of the indoxyl, obtained by shaking it out of the extract, can be evaporated at low temperature at the air, by which the indoxyl is left behind as a liquid soluble in water, which can be coloured by different impurities. Though the watery solution of this »purified indoxyl« is inconstant at the air, its oxidation to indigo-blue proceeds slowly enough for studying the influence wich different substances exert on this process.

Various circumstances have induced me to put anew the question, whether in this oxidation an oxidizing enzyme is active[1]). After much doubt I have finally,

---

[1]) Mr. Bréaudat erroneously asserts (Compt. rendus T. 127, p. 769, 1898 and T. 128, p. 1478, 1898) that in the extracts of *Isatis* indigo-white occurs, which, by an oxydase is turned into indigo-blue.

as before, come to the conclusion that such is not the case. My primitive uncertainty was caused by the very unequal acceleration of the oxidation of indoxyl solutions by different powders spread on the surface. So the oxidation is somewhat furthered by the crude enzyme of woad, and very strongly, by that of *Indigofera leptostachya*, but by boiling, the crude enzymes are by no means deprived of this property. By a minute comparison of the behaviour of crude indoxyl solutions prepared from isatan and indican, with »purified« ones[1]), I ascertained that, both in the crude enzymes and in the crude indoxyl solutions, there are present soluble and insoluble chemical compounds, which influence the quickness of the indoxyl oxidation, but which are not destroyed by enzyme poisons and by heating, and which accordingly have not the nature of enzymes.

Crude isatase has neither an oxidizing action on pyrogallol, hydrochinon, and guajac emulsion.

Though thus oxydase is wanting in the crude isatase, there is present in it, as in all such like powders, prepared at random from higher plants, peroxydase (»leptomine« of Raciborski)[2]), that is the enzyme which, in the presence of hydrogen peroxyd, colours guajac emulsion blue. But indoxyl is by no means oxidized by it to indigo.

6. *Nekrosis and Nekrobiosis.*

Living tissues can die off in two ways: by necrosis, that is the dying of the protoplasm with simultaneous destruction of the enzymes, and by necrobiosis, in which the protoplasm dies, but the enzymes remain active. The phenomenon, formerly described by me as the »blue stripe« in partly killed woad-leaves, on the confine of the living and the dead portions, which both retain their green colour, reposes accordingly on necrobiosis. The action of isatase on isatan explains this phenomenon satisfactorily and renders my former hypothesis of alkali formation at the dying of the protoplasm superfluous.

The simplest way to perform the experiment is to kill the tip of a young woad-leaf in a Bunsen flame, or in the vapour of boiling water, then to allow the leaf to remain at ordinary temperature, by which in the said part alone indigo precipitates. If the chlorophyll pigment is extracted with alcohol, then both the »living« and the »dead« parts become colourless, the portion between them blue. The phenomenon ist best distinguished in young woad-leaves; in older leaves with a higher acid percentage, it is hardly to be observed because the acid renders the isatase inactive.

In various other plants, too, nekrobiosis causes formation of pigments. If these pigments are brown or black, and if the experiment is performed in the usual way with the leaves of these plants, then the coloured stripe may become

---

[1]) Besides from woad I prepared indoxyl by decomposing in a closed bottle a 4 pCt. indican solution with indigo enzyme at 60° C. Moreover Mr. H. ter Meulen had the kindness to prepare for me in the Chemical Laboratory of the Polytechnical School indoxyl solutions in chemical way. The »purified« indoxyl was always obtained by ether extraction.

[2]) Berichte der Deutsch. Botan. Gesellsch., Bd. 16, pag. 52, 119, 1898.

still much more marked than in the woad. Particularly fit for this demonstration are the leaves of *Pyrus communis*, *Trollius*, *Aconitum*, *Asarum*, *Salix purpurea*, *Populus nigra* and several other species, which at necrobiosis turn of a jet black and at necrosis remain green. Pear-leaves especially are recommendable for the experiment; the enzyme in them is tyrosinase, the nature of the chromogene is unknown, tyrosine it is not. Hence, when preparing a herbarium, the chief thing to keep such plants uncoloured, is to prevent necrobiosis. This frequently happens of itself, as the acid cellsap is so much concentrated in drying, that enzyme action cannot occur; so in the drying of woad-leaves, where the highly sensitive isatase remains inactive. In other cases, to obtain this end, it will be necessary to destroy the enzyme, either by boiling water, or by poisonus vapours.

Sometimes necrobiosis gives rise to aromatic or stimulant matters, which are present in the plant itself as glucosides, from which they are set free by specific enzymes at the dying of the cells. This fact is well-known regarding the myronates and the myrosine of the Cruciferae, the amygdaline and emulsine of the Amygdaleae, the spiraeine, gaultherine and gaultherase of *Spiraea*. But it holds good, too, for the cumarine of *Asperula odorata*, which appears not in it as such, but as a glucoside, which by necrosis continues unchanged and hence can be removed from the plant by boiling, while there is besides in this plant a specific enzyme, which by necrobiosis produces from the glucoside cumarine. This enzyme is not identic with emulsine and differs likewise from gaultherase. In a quite corresponding way the aromas originate from the fruit of the vanilla and the roots of *Geum urbanum*.

The comparative study of necrosis and necrobiosis in plants shows the way for the detection of a number of new chromogenes or glucosides and specific enzymes.

Conclusions.

Indoxyl occurs not, as I formerly thought, in a free state in the woad but as a loose compound, called by me isatan.

Isatan is only constant in feeble acid solutions, and is obtained by extracting the woad therewith. It is decomposed, under formation of indoxyl, by alkalies and stronger acids, and in solutions, less acid than 1.5 cc. of normal acid per 100 cc., by an enzyme, isatase, which acts the most vigorously at 50^0 C., and occurs in all parts of the woad-plant.

Isatan is not decomposed by the indigo-enzymes nor by microbes in as much as the latter do not form alkali. Isatase does not act on indican.

Isatase is localized in the chromatophores, isatan in the protoplasm, which is in accordance with the formerly described localisation of the indigo-enzymes and of indican.

If woad is extracted without acid, so that the isatase can act, or with dilute alkalies, e. g. $^1/_2$ pCt. solution of dinatrium phosphate, indoxyl is produced.

The necrobiotic stripe in partly killed woad-leaves results from the action of isatase on isatan.

Sur la production de quinone par le Streptothrix chromogena, et la biologie de ce microbe.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome III, 1900, p. 327—340. — Verscheen onder den titel »Ueber Chinonbildung durch Streptothrix chromogena und Lebensweise dieses Microben« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, VI. Band, 1900, S. 2—12.

La quinone, $C_6 H_4 O_2$, appartient suivant la nomenclature de Schoenbein aux »ozonides« ou »porte-ozone (Sauerstoffträger«)«[1]), et peut dans certaines conditions oxyder d'autres substances. C'est là-des-sus p. ex. que repose l'expulsion de l'iode de sa combinaison avec la potassium en solution acide, une propriété très rare chez les corps organiques, et qui n'appartient qu'à un petit nombre de composés analogues, p. ex. le peroxyde de benzoyle. La production de quinone par un microbe a donc déjà en elle même un certain intérêt. La formation de ce corps par un *Streptothrix* donne à la chose une importance toute particulière, en ce que ce genre a probablement une part active à la formation d'humus dans le sol des forêts et le terreau des jardins. C'est une conviction que je me suis faite déjà depuis plusieurs années, et l'espèce que je cite ici sous le nom de *Streptothrix chromogena* Gasperini, je l'avais déjà longtemps avant qu'elle n'eût reçu ce nom, désignée dans ma collection sous le nom de *Streptothrix humifica*. Peut-être la production de quinone par ce microbe jettera-elle donc quelque clarté sur le phénomène encore si obscur de la genèse de l'humus. On ignore encore il est vrai quels sont les corps organiques qui sont oxydés dans le sol par la quinone, mais cela n'est à coup sûr qu'une question de temps. La quinone n'est stable qu'en solulion acide; en présence d'alcali elle se transforme en une matière colorante brune. Comme *Streptothrix chromogena* produit un alcali dans les milieux de culture non sucrés généralement en usage dans les laboratoires, c'est à l'oxydation de la quinone qu'il faut rapporter, au moins en partie, la coloration brune particulière qui caractérise cette espèce[2]). Quand la quinone agit comme oxydant sur d'autres substances, elle se transforme en hydroquinone et perd toute activité. On est donc conduit à se demander si en présence d'une »substance excitatrice d'oxygène« elle pourrait être régénérée? J'ai fait quelques expériences dans ce sens, qui sont encore il est vrai incomplètes, mais ont montré que la quinone et le saccharate ferrique, qui chacun isolément sont sans action sur la tyrosine, la

---

[1]) Voir p. ex. E. Bourquelot dans l'Année biologique, T. III, 1897 (1899), p. 434.

[2]) Aussi dans la peptone sèche du commerce se trouve-t-il une substance qui se colore en brun sous l'influence de la quinone.

transforment par leur action combinée, en solution neutre en un corps rouge, en solution alcaline en un corps noir; ces deux substances modifient donc la tyrosine d'une manière analogue, peut-être même identique, à celle découverte par M. Bertrand chez le ferment oxydant nommé tyrosinase. Il ne paraît pas cependant y avoir de régénération de l'hydroquinone à l'état de quinone, car je ne pus provoquer l'oxydation de la tyrosine au moyen de l'hydroquinone et de saccharate ferrique. Il est probable que d'autres oxydations peuvent s'opérer de même sous l'action de la quinone, de manière que *Streptothrix chromogena* doit être considéré comme un agent oxydant du sol, pouvant fonctionner non seulement par action de contact, mais de plus à grande distance, dans son entourage comme »excitateur d'oxygène«.

Cette circonstance m'engage à noter ce qui suit, relativement à la biologie de ce microbe.

1. Présence et séparation du Streptothrix chromogena.

J'aurai à parler ici de deux espèces de *Streptothrix*. L'une, que j'appris à connaître sous un grand nombre de variétés, sera désignée sous le nom de *S. chromogena* Gasperini[1]), parce que je crois que l'auteur aura eu affaire à une des variétés de cette forme. L'autre espèce sera nommée *S. alba*; je n'ai pu réussir, parmi les descriptions existantes des formes non chromogènes, à en trouver une qui se rapproche suffisamment de la mienne pour conclure à l'identité spécifique.

Les deux espèces se développent sous forme de petites végétations myceliformes qui, quand il y a sporulation, ressemblent à des espèces de moisissures inférieures, produisant des conidies. Ces végétations sont composées d'un »mycélium« très délicat et ramifié, rappelant cependant par sa structure la structure bactérienne, attendu que toute différenciation en paroi, protoplasme et liquide cellulaire est invisible. Il n'y a donc pas davantage formation de cloisons, et les ramifications sont distribuées sans ordre apparent sur les branches mycéliennes. Chez quelques variétés de *S. chromogena* le mycélium se désarticule de fort bonne heure en courts fragments, qui rappellent complètement certaines bactéries. L'épaisseur des mycéliums est très variable et peut dans certains cas égaler celle des minces filaments du *Penicillium*. Les vieilles cultures de *Streptothrix* présentent quelquefois de petites dilatations bulbiformes des rameaux mycéliens, qui rappellent les dilatations analogues de *l'Actinomyces*, d'ailleurs une forme de *Streptothrix*. Il n'est pas rare que les rameaux mycéliens se terminent en pointes recourbées en forme de griffe, qui jouant le rôle de filaments préhenseurs, se soudent aux particules d'humus du sol. Les spores prennent naissance à l'extrémité des »hyphes aériennes«, sous forme de chapelets conidiformes, secs, d'un blanc de neige, divisés en articles sphériques. On peut donc parler d'arthrospores. Aussitôt que la sporulation commence chez le *Streptothrix*, les mycéliums répandent une odeur de moisissure, très prononcée, rappelant le musc; de plus, tout au moins chez le *Streptothrix chromogena*, ils dégagent une »odeur de terre« caractéristique[2]). Les spores sont em-

[1]) Voir Kruse dans Flügge, Mikroorganismen, 2. Aufl., Bd. II, 1896, p. 63.

[2]) Je ne doute nullement que »l'odeur de terre« que l'on perçoit si souvent surtout dans le sol des forêts, ne soit provoquée par la présence du *S. chromogena*.

portées par les courants d'air; elles sont très résistantes, et douées d'une longue vie. Même chauffées dans l'eau, y en a-t-il plusieurs qui supportent des températures de 70 ou même 80° C.; si bien que l'on obtient parfois des cultures de *Streptothrix* aux dépens de matériaux pasteurisés. A 100° C. toutefois les spores semblent périr sans exception. Le *S. chromogena* donne plus difficilement des spores que le *S. alba*, et certaines variétés restent toujours aspores.

Les *S. chromogena* et *alba* sont des microbes très répandus dans la terre, surtout abondants dans les racines végétales et à leur surface. Je les trouvai dans le terreau de jardin jusqu'à 1 m. de profondeur; plus bas encore le nombre absolu des ces organismes n'est guère considérable, mais dépasse néanmoins celui des autres microbes du sol. Cela démontre leur résistance à l'égard des conditions défavorables pour leur nutrition. Dans le sable des dunes j'en démontrai la présence jusqu'à 2 m. de profondeur, et le *S. chromogena* fut trouvé dans la boue de la Meuse devant Kralingen jusqu'au delà de 3 m. au-dessous du niveau des eaux. Dans les eaux de la Meuse elles-mêmes, les deux formes ne sont nullement rares. On sait que le *S. chromogena* se rencontre fréquemment dans les laboratoires sur les plaques à l'extrait de viande gélatiné, exposées à l'air. Elles se distinguent par la production d'un pigment brun, qui diffuse à grande distance.

J'ai dit que le *Streptothrix* se rencontre très généralement dans les racines et à leur surface, où il habite les couches cellulaires superficielles de ces dernières, et s'y conduit comme un saprophyte et non comme un parasite. J'ai étudié comme suit les racines et les autres organes végétaux souterrains. La surface fut d'abord soigneusement lavée à l'eau bouillie, et essuyée avec un linge. Cette opération ayant été répétée un certain nombre de fois, les matériaux furent réduits en bouillie dans un mortier d'agate de manière à pouvoir admettre que beaucoup de cellules avaient été ouvertes et les filaments mycéliens, qui sont agglomérés en peloton, désagrégés. La bouillie fut alors diluée dans l'eau stérilisée, et étalée à la surface d'une plaque à l'extrait de viande gélatiné. Ordinairement au bout de 3 à 5 jours, les colonies de *Streptothrix*, si l'organisme était présent, se montraient par centaines. Il se développe naturellement aussi plus ou moins de colonies bactériennes, mais le nombre en est d'autant plus petit que la surface de la racine a été plus soigneusement nettoyée. Comme les bactéries se montrent bien plus rapidement dans les cultures que le *Streptothrix*, et que surtout les espèces liquéfiantes arrêtent le développement de cette forme, il importe de les enlever aussi complètement que possible par lavage. On voit donc à toute évidence que le *Streptothrix* ne peut provenir, comme les bactéries, tout simplement des particules du sol adhérentes à la surface des racines; il doit sans le moindre doute provenir des cellules radiculaires elles-mêmes. Je dois toutefois conclure d'expériences de culture rigoureuses, que seules les cellules mortes des racines renferment des filaments de *Streptothrix*, de telle sorte que, comme je l'ai dit, il ne peut être question ici de parasitisme.

La première plante que j'étudiai de la manière indiquée était un vieil exemplaire cultivé d'*Aspidium Filix mas*. Ce n'était pas seulement la surface radiculaire elle même, mais aussi l'entourage immédiat qui était rempli du *Streptothrix*; seulement à une distance d'un décimètre environ de la plante le nombre en diminuait très notablement. Il est clair que les portions mortes des racines avaient formé

un milieu de culture très favorable. La deuxième plante était un exemplaire de *Struthiopteris germanica*, provenant d'un autre jardin, qui me donna un résultat presque identique. *L'Osmunda cinnamomea* se comporta d'une manière analogue.

Au contraire, chez une série d'autres plantes, il ne me fut pas possible de cultiver le *Streptothrix* aux dépens des racines nettoyées, ou seulement dans des cas isolés, où leur présence doit tenir à des particules de terre adhérentes chargées de germes du microce. Ici se rangent de nombreuses racines de Papilionacées ainsi que leurs nodosités; puis le tabac, dont je me suis très spécialement occupé; enfin les Graminées.

Ces résultats négatifs m'amenèrent à me demander si quelque propriété spécifique du *Streptothrix* permettrait d'expliquer ou de rendre probable sa présence dans les racines d'une espèce déterminée. Je soupçonnai que les matières brunes, humiques, si caractéristiques pour la surface de beaucoup de racines, et qui sont évidemment en rapport avec leur teneur en tannin, pourraient bien avoir quelque relation avec sa distribution, et je me vis ainsi conduit à examiner d'autres écorces radiculaires colorées en brun au même point de vue.

Le résultat répondit à mon attente. J'examinai p. ex. les racines de *Quercus pedunculata*, *Corylus Avellana*, *Fagus sylvatica*, *Ulmus campestris*, *Alnus glutinosa*, et j'obtins aux dépens de toutes un développement énorme de *S. chromogena*, parfois aussi de *S. alba*. Très soigneusement nettoyées par un lavage prolongé, les racines fournissaient des plaques qui ne m'offraient souvent que des colonies de *Streptothrix* seulement. Ce dernier résultat fut obtenu p. ex. avec de racines d'orme, qui me donnèrent quatre variétés différentes du *S. chromogena*; puis encore avec les racines de chêne et de coudrier.

Je décrirai un peu plus en détail les expériences sur les racines du chêne. Je m'efforçai d'abord de constater de quelle manière la distribution du *Streptothrix* est en relation avec l'âge des racines. Je nettoyai à cet effet les ramifications terminales coralliformes, encore recouvertes de poils radicellaires et de la coiffe; elles furent ensuite triturées et servirent aux ensemencements. Je rencontrai le *S. chromogena*, mais seulement en nombre extrêmement restreint. Je me servis ensuite de diverses racines recouvertes de myceliums fongiques, notamment une racine noire, recouverte d'un mycélium très adhérent, et une autre racine blanche, couverte de flocons blancs, formant une couche lâche très épaisse, et répandant une forte odeur de terre. Ces deux racines provenaient de mon jardin, bien qu'elles y fussent rares, comparées aux racines normales [1]). L'ensemencement me donna des colonies isolées de *S. chromogena*. J'étudiai en troisième lieu les portions plus âgées des racines, encore recouvertes de l'écorce primaire, mais où commençait déjà l'accroissement secondaire, et où peut être il y avait donc déjà un début de dépérissement dans les cellules corticales primaires. Le *S. chromogena* s'y rencontre en masse. Comme j'ai obtenu des résultats analogues chez les autres racines d'arbres que j'ai examinées, j'en conclus que le *S. chromogena* a une préférence marquée pour les cellules de l'écorce des racines en voie de périr. Une plante herbacée, que j'examinai également à cause de sa haute teneur en

---

[1]) Ces myceliums appartiennent au *Merulius* ou un genre de Basidiomycètes connexe. Ce sont eux qui ont conduit à admettre le fameux »mycorhiza«.

tannin, savoir le *Polygonum bistorta*, me donna des résultats analogues; toutefois les colonies que j'en isolai appartiennent uniquement au *S. alba*.

Finalement j'étudiai encore les radicelles extrêmement ténues des *Rhododendron ponticum*, *Azalea mollis*, *A. indica* et *Calluna vulgaris*. Toutes me fournirent de nombreuses colonies de *Streptothrix* évidemment issues de la terre adhérente, qui ne se laissait que difficilement enlever des radicelles enchevêtrées. Mais le diagnostic fut rendu beaucoup plus difficile par la présence en masse de bactéries fortement liquéfiantes, surtout le *B. fluorescens liquefaciens*, et une bactérie pigmentaire bleue particulière (*Bacillus caeruleus* n. s.), généralement répandue dans le sol riche en humus.

Je suis obligé d'admettre que le *Streptothrix* n'a de préférence pour les racines que parce qu'il trouve dans leur voisinage comme à leur surface une nourriture appropriée. Il n'y a pas lieu d'admettre une autre influence spécifique de la racine vivante.

2. *Conditions de nutrition et rôle de S. chromogena dans la terre arable.*

Malgré que je sois donc d'avis, que l'on ne peut songer ici à une relation symbiotique dans le sens ordinaire, je crois cependant probable que le *Streptothrix* doit être utile aux plantes d'une manière quelconque, et que les conditions de nutrition de cet organisme pourront nous renseigner sur cette utilité. Le *Streptothrix* appartient aux microbes omnivores, et peut vivre et se multiplier dans les conditions les plus luxuriantes au point de vue de la nutrition comme dans la plus grande disette. Il y a p. ex. développement intense dans le bouillon de viande et le moût de bière, qui appartiennent aux milieux de culture les plus favorables aux microbes; mais le *Streptothrix* est d'autre part capable de donner des cultures assez abondantes dans un liquide de la composition que voici: eau distillée renfermant 0,05 % KH_2PO_4 0,05 % $MgSO_4$ et 1 % de glucose, l'azote combiné n'étant donc pas expressément ajouté. Vers 28° C. il se forme dans ce liquide comme dans le bouillon, au bout de 3 à 4 jours, des flocons abondants, ressemblant à des végétations de moisissures, qui ne se résolvent pas en filaments isolés. On se tromperait cependant fort si l'on croyait que le *Streptothrix* ne réclame nullement d'azote combiné; il y en a dans l'eau distillée elle-même et dans l'air du laboratoire en quantité suffisante pour couvrir les exigences modestes du *Streptothrix*, et des expériences spéciales m'ont persuadé qu'il n'y a pas fixation de l'azote atmosphérique libre par cet organisme. Je ne puis cependant négliger de mentionner que les besoins d'azote sont ici remarquablement faibles, et pourraient superficiellement faire croire l'inverse. En présence de glucose, toute combinaison azotée peut être assimilée; c'est ce que je pus démontrer spécialement pour les sels ammoniacaux, les nitrates et les nitrites, l'asparagine et la peptone, surtout à forte et très forte dilution.

La fixation des moindres traces d'azote combiné dans les racines et leur voisinage immédiat peut être utile en ce qu'elle contrarie les déperditions d'azote par écoulement des eaux; de plus, quand les filaments de *Streptothrix* meurent et se désorganisent, cet azote peut être mis de nouveau à profit par les plantes.

Il vient s'ajouter à ce qui précède qu'il peut être important pour les plantes que dans le sol s'accomplissent certains phénomènes vitaux intenses, qui ne peuvent être accomplis que par des microbes déterminés, et non par les racines des plantes, ou par les bactéries terricoles ordinaires. Je songe ici tout particulièrement aux phénomènes encore si mystérieux, qui doivent s'accomplir dans la formation de l'humus, et auxquels les *Streptothrix*, aussi bien le *S. chromogena* que le *S. alba*, prennent incontestablement part, si même ils n'y jouent pas un rôle prépondérant. Ces organismes sont particulièrement aptes à intervenir ici, tant par les conditions qui régissent leur nutrition, que par les propriétés suivantes. Ils sont anaérobies facultatifs, c'est-à-dire temporaires, et se rapprochent par là des bactéries, en s'écartant de la plupart des vraies moisissures, dont les rapproche cependant leur type de croissance. Ils produisent des enzymes tryptiques et diastatiques. Ils sont capables de se nourrir aussi bien dualistiquement aux dépens d'une substance carbonée quelconque et d'une matière azotée séparée, qu'aux dépens de matières albuminoïdes, surtout des peptones. Cela les distingue de nombreux autres microbes terricoles, qui ne se nourrissent que dualistiquement, et qui sont donc adaptés à des conditions d'existence bien plus étroites. Finalement le *S. chromogena*, comme il est décrit en détail ci-dessous, produit de la quinone, c'est-à-dire un corps qui peut agir comme ozonide ou véhicule d'oxygène. Je crois que cet organisme peut déployer dans les organes végétaux morts une activité toute spéciale, et en seconder énergiquement l'humification, tandis qu'il est probable que la quinone joue ici un rôle important. Le *Streptothrix* ne provoque guère de fermentations spéciales des matières sucrées, et cela peut avoir son importance, attendu qu'il ne sera pas ainsi la cause de pertes sensibles en combinaisons carbonées. Le glucose et d'autres espèces de sucres produisent seulement des traces d'acide, probablement de l'acide lactique.

Une propriété particulière du *Streptothrix*, c'est encore son pouvoir énergique de réduction des nitrates à l'état de nitrites. Bien que cette propriété soit un apanage de nombre de bactéries terricoles, il n'y en a probablement pas une qui soit plus active sous ce rapport. Il ne serait pas impossible que l'action des nitrites sur les sels ammoniacaux en présence d'anhydride carbonique, d'acide humique ou d'autres acides organiques provoque le dégagement d'azote libre; toutefois il ne pourrait s'agir ici que de pertes minimes d'azote, et ceci uniquement dans le sol des jardins ou des champs cultivés. En effet, dans le milieu proprement dit du *Streptothrix*, le sol des forêts, on sait que les nitrates et les nitrites font presque complètement défaut. D'ailleurs, d'une manière générale, je considère ce phénomène comme tout à fait insignifiant au point de vue quantitatif; et je suis persuadé que les pertes éventuelles d'azote qui s'observent dans le sol et dans le fumier, sont dues au dégagement d'azote et d'ammoniaque par oxydation complète des substances organiques, sous l'influence surtout des bactéries vulgaires.

Résumant mon opinion sur les rapports des *Streptothrix* avec les racines végétales, je dirai que ces microbes peuvent devenir utiles aux plantes par leur biologie particulière, leurs conditions de nutrition et la part qu'ils prennent à la production de l'humus.

3. *Sur la manière de déceler la quinone dans les cultures de S. chromogena.*

Je fus rendu attentif à la production de quinone chez le *S. chromogena* par la découverte de trois réactions dans les cultures sur gélatine, réactions charactéristiques de la benzoquinone.

Tout d'abord, j'avais remarqué que les sels ferriques communiquent une teinte noirâtre à la gélatine brunie par le *S. chromogena* ou à une culture en solution de peptone. Je constatai ensuite que la gélatine de vieilles cultures est devenue insoluble dans l'eau bouillante, tout à fait comme quand on a fait agir sur la gélatine de la quinone libre ou un sel de chrome à la lumière. Cette réaction est très caractéristique de la quinone et, comme on s'en assure aisément, toute différente de l'action du tannin, à laquelle on songe involontairement dans les phénomènes de ce genre. C'est sur la production d'une combinaison insoluble de la gélatine et de la quinone que repose une autre propriété du *S. chromogena*. Cet organisme secrète de la trypsine, mais ne donne lieu que très peu de temps à une liquéfaction de la gélatine, et seulement à l'endroit où il est en contact direct avec elle, où il a donc pu agir énergiquement avant que la gélatine ne fût durcie par la quinone.

Je n'aurais toutefois jamais considéré cette réaction suffisante pour l'identification de la quinone, si je n'avais en outre observé la propriété très importante des cultures de *S. chromogena* de mettre, en présence d'acide chlorhydrique, de l'iode en liberté aux dépens d'iodure de potassium, décomposition que l'on peut déceler sans peine au moyen d'empois d'amidon. Cette réaction, dans les cultures bien réussies, est si intense que je croyais d'abord qu'elle ne pouvait provenir que de la présence d'acide nitreux. Mais on montre aisément qu'il n'en est pas ainsi, car toutes les autres réactions caractéristiques de l'acide nitreux, telles p. ex. que la réaction avec la diphénylamine, font défaut dans les cultures de *S. chromogena* sans nitrate de potassium, qui cependant donnent très énergiquement la réaction avec l'empois ioduré.

Comme la formation de quinone n'a lieu qu'en présence d'un excès d'oxygène, elle est surtout abondante dans les cultures sur gélatine, moins forte dans les solutions nutritives, dans lesquelles la plupart des mycéliums de *Streptothrix* descendent au fond.

Pour déceler la quinone dans les cultures sur substratum solide, on peut se servir des milieux les plus divers. On obtient par exemple un bon résultat de la manière suivante:

On dissout de la gélatine du commerce dans de l'eau ordinaire de la canalisation; la solution renfermant 10°/o de gélatine, est légèrement acidulée au moyen de quelques gouttes d'acide lactique et additionnée d'un peu d'amidon. On l'étale en une couche mince dans une cuvette; après solidification on inocule à la surface soit par stries soit en colonies le *S. chromogena*. Maintenue vers 23° C. la culture commence à se développer au bout d'une couple de jours; en même temps se montre le brunissement de la gélatine par suite de l'oxydation lente d'une portion de la quinone formée. Cette oxydation toutefois est ralentie par la présence d'acide, et la quinone s'accumule. Si donc on verse sur la gélatine de l'iodure de potassium, dissous dans l'acide chlorhydrique, on verra apparaître une coloration bleue intense partout où la quinone s'est propagée par diffusion.

La réaction réussit d'ailleurs aussi très bien sur la gélatine ordinaire au bouillon de viande, à condition que ce milieu ne soit pas alcalin. Elle est tout aussi belle, sinon plus belle encore, sur l'agar pur, sans autre addition qu'une trace d'acide ou de $KH_2 PO_4$ et d'un peu d'amidon; c'est-à-dire sur un milieu que l'on peut comparer à une feuille en train de se décomposer, ou d'autres matériaux analogues se rencontrant dans le sol.

Des plaques fraîches d'urine gélatinée sont aussi propres à la culture.

Cependant, on doit toujours songer que la quinone est instable à l'air en solution alcaline, et que l'on devra donc, pour compter par exemple le nombre des colonies de *Streptothrix* issues d'ensemencements de terre ou d'humus, opérer sur une gélatine amidonnée de réaction faiblement acide. Traitées par l'iodure de potassium et l'acide chlorhydrique, des plaques de cette nature donnent une idée réellement surprenante de la richesse du sol en *S. chromogena* et, comme on peut en déduire, en quinone libre.

Au cas où l'on désire démontrer la production de quinone dans les cultures liquides, il est à recommander que l'on fasse usage, soit d'un bouillon de viande faiblement acidulé, soit d'une solution de peptone dans l'eau de canalisation; on ajoutera dans l'un comme dans l'autre cas un peu d'amidon, et l'on cultivera vers 28 ou 30° C., qui se sont montré être les températures optimales. La démonstration de la présence de quinone et son dosage quantitativ peuvent se faire comme d'habitude au moyen d'iodure de potassium et d'amidon.

L'on peut de la manière suivante déceler directement la quinone sous forme de quinhydrone.

Je me préparai des cultures abondantes de *S. chromogena* dans des solutions renfermant, sur 100 parties d'eau de canalisation, 0,05 KH_2PO_4, 0,05 $(NH_4)_2SO_4$ 3°/o de glucose. Ces cultures furent ensuite versées à la surface de plaques de gélatine, dans de grandes boîtes de verre. La composition de la gélatine était la suivante: 100 d'eau de canalisation, 10 de gélatine, 0,5 $KH_2 PO_4$ et 0,1 d'amidon soluble. Ce procédé a l'avantage que la surface entière de la gélatine est complètement recouverte d'une végétation bien développée de *S. chromogena*, qui commence aussitôt à former de la quinone. Au bout d'un ou deux jours la plaque est complètement imbibée de quinone. Il est vrai que le *S. chromogena* produit un peu d'alcali, qui provoque l'oxydation de la quinone, mais la durée de la culture n'est pas nécessairement assez longue pour entraîner la déperdition de beaucoup de matière. On fait alors fondre les plaques, extrait la quinone en secouant avec du benzol, et mélange la solution avec une solution benzolique d'hydroquinone. L'évaporation lente me donna quelques aiguilles cristallines isolées de quinhydrone, très reconnaissables à leur dichroïsme et quelques autres propriétés caractéristiques. Toutefois l'extraction de la gélatine liquéfiée par le benzol n'est pas facile parce qu'il se forme une émulsion très difficile à séparer. Je n'ai pu obtenir de quinhydrone aux dépens des liquides nutritifs.

4. *Comment la quinone se forme-t-elle?*

Il y a trois manières essentiellement différentes dont la cellule vivante produit des substances chemiques: 1° comme produits de dédoublement du protoplasme lui-

même; ces substances peuvent être nommées autobolites[1]); 2° comme produits de décomposition d'un corps étranger, sur lequel le protoplasme agit catalytiquement; ce sont les catabolites; et 3° comme produits d'une action enzymatique; ces produits peuvent dans certaines conditions prendre naissance à plus ou moins grande distance du protoplasme actif; ce sont les télébolites. Les catabolites à leur tour se divisent en deux groupes, suivant qu'ils prennent naissance par simple dédoublement des corps étrangers: ce sont les schizobolites; ou par dédoublement avec absorption simultanée d'autres corps: ce sont les hétérobolites. On sait que les produits des actions enzymatiques, les télébolites, peuvent également se former soit comme schizobolites soit comme hétérobolites; dans ce dernier cas avec absorption d'eau ou d'oxygène[2]).

Les actions des levûres sont très propres à rendre cette subdivision plus évidente. La sécrétion d'invertine se fait sans doute aux dépens du protoplasme et cet enzyme est donc un autobolite. Le dédoublement du saccharose par l'invertine donne les télébolites glucose et lévulose. La production d'alcool aux dépens de ces sucres se fait par une action catalytique du protoplasme vivant; l'alcool est donc un catabolite[3]).

Dans lequel de ces trois groupes faut-il ranger la quinone? Comme on ne saurait songer à la production enzymatique de cette substance, il s'agit de décider si elle se forme comme autobilite ou comme catabolite.

Je crois, d'après les conditions de nutrition du *S. chromogena*, que la quinone doit être considérée comme un produit cataboliste de set organisme, et prend naissance par l'action du protoplasme du *S. chromogena* sur la peptone ou un corps analogue.

En effet, la richesse en quinone des cultures n'est nullement en rapport avec leur richesse en *Streptothrix*, mais bien avec la teneur en albumine ou en peptone du liquide de culture.

C'est ainsi qu'une des meilleures solutions nutritives pour le *S. chromogena*, que je connaisse jusqu'à présent, a la composition suivante: 100 parties d'eau de la canalisation, 3 de glucose, 0,1 d'amidon, 0,05 de phosphate monopotassique et 0,05 de sulfate ammonique. Vers 27° C. il s'y forme au bout de peu de jours une végétation extrêmement développée de *S. chromogena*, en partie submergée, en partie flottante. Néanmoins la production de quinone y est si peu abondante que la réaction à l'iodure d'amidon y est extrêmement faible, tandis qu'après l'addition de chlorure ferrique ou d'alcalis, la culture, antérieurement incolore,

---

[1]) De βολις, flèche, ce qui est lancé.

[2]) Bien qu'à mon avis le mot »fermentation« ne doive s'appliquer qu'aux phénomènes catabolistes dans lesquels il y a dégagement de gaz, il me paraît que de nombreux auteurs, qui prennent l'expression de fermentation dans un sens bien plus large, et parlent p. ex. de fermentation pigmentaire, mucique, etc., sont tentés, sans se douter de la différence entre auto- et catabolisme, de considérer tous les phénomènes catabolistes comme fermentations. Mais si l'on identifie ces deux classes de phénomènes, on commet une erreur d'histoire scientifique.

[3]) Je lis avec surprise que M. E. Buchner, qui a constaté le fait intéressant que l'on peut exprimer le protoplasme vivant de la cellule de levûre, sans qu'il perde directement son pouvoir de provoquer la fermentation alcoolique, défend encore l'opinion inadmissible, qu'il s'agit ici d'une action enzymatique.

demeure incolore. Si la réaction avec l'iodure d'amidon ne fait dans ce cas pas complètement défaut, cela s'explique à mon avis par ce que la mort inévitable de fragments mycéliens du *S. chromogéna* fournit à l'action tryptique d'ailleurs assez faible de cet organisme des matériaux capables de donner des peptones, aux dépens desquelles se forme à son tour de la quinone. Cependant la quantité dont il s'agit ici est extrêmement faible, vu la grande sensibilité de la réaction iodée.

Si dans la solution susnommée on remplace le sulfate d'ammoniaque par de l'asparagine ou du nitrate de potassium, le résultat reste identique. Mais il est clair que si l'on fait usage de ce dernier corps on ne peut employer l'amidon ioduré pour déceler la quinone, attendu que le salpêtre donne du nitrite de potassium, et ceci avec une rapidité et une intensitê surprenantes[1]). On doit donc avoir recours ici aux décolorations par l'alcali ou les solutions ferriques; or celles-ci font complètement défaut dans ces conditions, de sorte que ni le glucose avec l'asparagine, ni le glucose avec un nitrate ou un nitrite ne sont des sources de quinone.

Il en est tout autrement quand il y a, dans les solutions, de la peptone ou un autre corps albuminoide quelconque. C'est alors, et alors seulement qu'il y a production abondante de quinone. Je crois donc avoir démontré mon hypothèse que seulement la peptone ou un albuminoïde donnent par catabolisme de la quinone.

3 décembre 1899.

---

[1]) J'ai déjà observé antérieurement que je ne connais pas d'autre microbe que l'on puisse comparer au *S. chromogena* pour l'intensité de la formation de nitrites aux dépens de nitrates.

Ueber die Wirkung des Benzylsenföls auf das Wachstum des Kahmpilzes.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, VI. Band, 1900, S. 72.

Gelegentlich einer Besprechung der Glukoside und Enzyme der Spiräen in diesem Centralbl. 2. Abt. Bd. V. 1899. p. 429 habe ich über einige Erfahrungen berichtet in Bezug auf die außerordentlich kräftige Wirkung des flüchtigen Oels der Kapuzinerkresse (Tropaeolum majus) auf das Wachstum des Kahmpilzes (Saccharomyces mycoderma). Ich habe gesagt, daß ich Gadamer's Ansicht, nach welcher dieses Oel Benzylsenföl ist, nicht beipflichten konnte, daß dasselbe sich beim Destillieren teilweise zersetzte unter Schwefelabspaltung, und vielleicht ein Oxybenzylsenföl darstellen könnte.

Nach erneuten Untersuchungen, welche Herr H. ter Meulen auf meine Veranlassung begonnen, hat Gadamer jedoch vollständig recht, und sind meine Bemerkungen unbegründet.

Sowohl Kapuziner- wie Gartenkresse (Lepidium sativum) enthalten ein und dasselbe Glukosid, welches, wie Gadamer richtig angiebt, mit Myrosin gewöhnliches Benzylsenföl abspaltet. Dieses natürliche Benzylsenföl ist identisch mit dem synthetisch dargestellten und kann bei der nötigen Vorsicht unzersetzt destilliert werden. Herr ter Meulen hat durch quantitative Schwefelbestimmungen festgestellt, daß auch die Wirkung des natürlichen Oels auf das Wachstum von Mycoderma identisch ist mit demjenigen des synthetischen. Ein Milligramm von beiden Präparaten ist zureichend, um das Wachstum des Kahmpilzes in 100 ccm Bier vollständig aufzuheben.

22. Dezember 1899.

Sur la formation de l'hydrogène sulfuré dans les canaux, et le genre nouveau Aërobacter[1]).

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome IV, 1901, p. 1—18. — Verscheen onder den titel »Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgräben und Aufstellung der Gattung Aërobacter« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, II. Abteilung, VI. Band, 1900, S. 193—206.

Il y a quelques années[2]), j'ai rendu compte de la découverte d'un *Spirillum* anaérobie obligatoire, non sporulant, dans lequel j'ai reconnu l'agent de la réduction des sulfates dans les canaux de nos villes, et que j'ai nommé pour cette raison *Spirillum desulfuricans*. J'ai à cette même occasion émis quelques considérations sur le cycle du soufre dans la nature, et montré que l'hydrogène sulfuré d'origine biologique peut encore prendre naissance par trois autres processus, savoir, par la décomposition de matières albuminoïdes, directement aux dépens du soufre libre, et enfin aux dépens des sulfites et des thiosulfates. Le soufre, ainsi que ses combinaisons oxygénées les plus simples, passent, au contact de certains microbes, avec une grande facilité, à l'état d'hydrogène sulfuré. Il suffit d'introduire ce corps dans une solution sucrée en fermentation alcoolique pour s'en convaincre. Mais comme je l'ai dit, la réduction sulfatique tout au contraire est un phénomène absolument particulier, qui n'est dû qu'à un seul agent déterminé et ne peut être provoqué par les bactéries ordinaires[3]).

Il va de soi que toute espèce de bactéries, admettant que leur protoplasme renferme du soufre, pourraient à mon avis décomposer des sulfates afin de se procurer cet élément; il en résulterait qu'après leur mort, le soufre pourrait être mis en liberté comme hydrogène sulfuré par d'autres microbes aux dépens des albuminoïdes dont leur protoplasma est constitué. Cependant les recherches faites dans ce but, en partie avec les bactéries acétifiantes, en partie avec les *Bacterium coli commune* et *B. lactis*

[1]) J'emploie ici la désignation hydrogène sulfuré pour la production, non seulement de ce corps sensu stricto, mais encore des autres sulfures biogènes, qui peuvent transformer l'acétate de plomb en sulfure.

[2]) *Centralbl. f. Bakt.*, 2e Abt., Bd. I, 1895, p. 1. — *Académie des sciences d'Amsterdam*, 1895. — *Arch. Néerl.*, T. XXIX, 1896, p. 233.

[3]) La question de la réduction des sulfates, malgré mes recherches, est encore très mal comprise, comme je m'en aperçois une fois de plus dans un article de la »*Wochenschr. f. Brauerei*«, Jahrg. XVI, 1899, p. 688, où M. Windisch prétend que la levûre de bière produit de l'hydrogène sulfuré aux dépens du gypse. Cette opinion est complètement erronée. La levûre ne réduit les sulfates en aucune manière; elle ne peut même pas réduire les nitrates à l'état de nitrites. Mais elle produit avec la plus grande facilité de l'hydrogène sulfuré aux dépens des corps albuminoïdes, des sulfites, des thiosulfates et du soufre.

aërogenes, ont montré que dans les liquides nutritifs d'où le soufre était exclu aussi complètement que possible, ces microbes se développaient tout aussi vigoureusement que si on leur offrait en même temps des combinaisons sulfurées. Il semble donc tout au moins que le protoplasme de ces bactéries est privé de soufre. Je ne crois pas cependant cette question complètement tranchée.

Dans mon travail sur la réduction des sulfates, j'ai dit croire possible que le sulfate pourrait fournir, outre de l'acide sulfhydrique, un peu de sulfite ou d'hyposulfite. Maintenant que je connais mieux les phénomènes, je crois devoir conclure qu'il n'en est pas ainsi: tout le sulfate se transforme à la réduction en hydrogène sulfuré ou en combinaisons dont l'acide chlorhydrique déplace autant d'acide sulfhydrique qu'il correspond au sulfate disparu. Le déficit d'hydrogène sulfuré que j'avais constaté jadis par la méthode iodométrique, doit donc être attribué sans doute à du soufre combiné dans des matières organiques ou éliminé à l'état pur, fait que j'avais alors admis comme probable, mais que je crois à présent démontré.

La signification biologique de la réduction des sulfates, c'est-à-dire la question de l'utilité de ce phénomène pour les microbes actifs, surtout en présence du développement colossal qu'elle prend par exemple dans les estuaires des Pays-Bas, me porte à croire à quelque grand avantage résultant de la réduction pour son agent. Peut-être s'agit-il ici de créer un milieu ayant une affinité extraordinaire pour l'oxygène; ce milieu déprimerait la tension de ce gaz, que l'action très variable des courants et des vagues amènent sans cesse dans les couches profondes, et pourrait en régulariser l'afflux à tel point que la microaérophilie du ferment sulfatique »anaérobie« serait satisfaite sans interruption. Je suis en effet persuadé qu'ici aussi il y a microaérophilie et que l'oxygène combiné dans le sulfate ferreux ne suffit pas à couvrir les besoins d'oygène libre [1]). Peut-être aurai-je plus tard l'occasion de revenir sur le phénomène biologiquement et géologiquement très important de la formation d'hydrogène sulfuré dans les estuaires.

1. *Production d'hydrogène sulfuré dans les canaux des villes.*

Malgré que la réduction des sulfates, qui se fait aussi bien dans l'eau douce que dans l'eau salée, produise de beaucoup la plus grande partie de l'hydrogène sulfuré formé dans la nature, il n'en est pas moins indubitable que dans notre entourage ce corps ne se forme pas seulement aux dépens des sulfates, mais aussi des albuminoïdes et du soufre libre. Les albuminoïdes sont introduits dans nos canaux en partie par les eaux ménagères, en partie aussi par la mort des organismes vivants. Ce sont surtout les sulfures formés à la surface des eaux, où ils s'évaporent, qu'il faut considérer comme provenant des albuminoïdes et du soufre libre; tandis que la réduction des sulfates demeurera plus étroitement localisée dans le limon des couches profondes, parce que c'est là seulement que l'anaérobiose durable est assurée, et avec elle l'existence du *Spirillum desulfuricans.* L'acide sulfhydrique formé de l'une ou de l'autre de ces deux manières dans les couches profondes rencontrera en remontant de

---

[1]) Voir pour les détails sur la microaérophilie et la putréfaction des albuminoïdes mon travail sur »Les anaérobies et l'oxygène libre«, dans les *Arch. Néerl.*, Sér. 2, T. II, 1899.

l'oxygène dissous, et provoquera ainsi le dépôt de soufre, auquel doivent contribuer aussi les sels ferriques, ainsi que je l'ai exposé antérieurement. Or ce soufre se retransforme très facilement en hydrogène sulfuré, ce qui, comme nous le verrons, est dû aux mêmes bactéries, qui prennent une part très active à la formation de sulfures aux dépens des albuminoïdes.

Quand la quantité des corps organiques dans *la vase* est très considérable, comme p. ex. dans les caneux de Delft, où les tanneries et distilleries écoulent depuis longtemps leurs eaux de déchet, les conditions d'existence des anaérobies ordinaires de la putréfaction des albuminoïdes [1]) sont réalisées, tandis que le *Spirillum desulfuricans* est moins abondant, à cause de l'accumulation des matières organiques. Parmi les espèces qui entrent en ligne de compte dans la putréfaction des albuminoïdes, j'ai parlé des trois principales (*Proteobacter septicum, P. skatol, P. pseudopulcher*), à une autre occasion. Il a été démontré depuis que ces microbes produisent non seulement de l'hydrogène sulfuré, mais encore les affreux sulfures du groupe du mercaptan.

Cependant il est établi que dans *l'eau* des canaux il y a en dissolution trop d'oxygène pour permettre la vraie putréfaction des albuminoïdes; et il est tout aussi certain que cependant cette eau, et plus spécialement même les couches superficielles de cette eau, perdent leurs albuminoïds sous l'influence de ces microbes, avec production d'acide sulfhydrique. Les formes dont il s'agit ici doivent donc être organismes aérobies ou anaérobies facultatifs (plus exactement temporaires), et opérer la décomposition ci-dessus quand l'accès de l'oxygène est limité.

Il n'est donc pas sans importance de résoudre la question, à quelles espèces ces microbes appartiennent en majorité; et de rendre visible, même en présence d'air, la production d'hydrogène sulfuré dont ils sont les agents, de telle manière que la détermination du nombre des organismes producteurs de sulfures soit possible dans un échantillon d'eau donné.

2. *La réaction au blanc de plomb.*

J'ai trouvé la solution de cette question dans un dispositif que je nommerai la »*réaction au blanc de plomb*«. J'ai reconnu que le blanc (carbonate) de plomb, quand on l'ajoute aux substratums un peu alcalins ordinairement en usage pour les cultures bactériologiques, ne contrarie que très peu la croissance. Les formes dégageant de l'acide sulfhydrique surtout sont à peine sensibles au sel de plomb, peut-être justement parce que les traces qui passent en solution sont immédiatement transformées en sulfure insoluble et inactif. Il est vrai que certaines bactéries de l'eau à développement lent, qui ne croissent que très mal même sur les plaques ordinaires à l'extrait de viande gélatiné, et qui n'ont guère qu'une importance toute relative dans l'examen ordinaire des eaux, subissent l'influence nuisible du plomb; mais ceci n'enlève naturellement rien de sa valeur à l'expérience. Celle-ci peut-être faite de la manière suivante.

On ajoute à de l'extrait de viande gélatiné ou gélifié (par l'agar) une quantité suffisante de blanc de plomb pour que l'on puisse en couler des plaques d'un blanc de neige égal. Si on verse à la surface de ces plaques de l'eau de canal diluée d'eau stérilisée, et qu'on cultive à 23° C., on voit au bout d'un ou deux jours se développer

tous les germes producteurs de sulfures sous forme de colonies brunes, les autres sous forme de colonies incolores. Comme le sulfure de plomb déposé dans les colonies brunes est stable au contact de l'air, cet état persiste et se dessine de plus en plus nettement. Des stries sur plaques au blanc de plomb neuves empruntées à des colonies de microbes sulfurogènes se comporteront de même et se développeront en cultures brun foncé. Dans les cultures un peu plus âgées, où les colonies sont déja assez grandes pour continuer à exercer leurs fonctions, en vertu de leur anaérobiose temporaire, même à l'abri de l'air, la formation de sulfure de plomb peut être rendue encore plus intense en recouvrant les colonies d'une plaque de verre intimement appliquée sur la gélatine. On empêche ainsi l'évaporation ou l'oxydation d'une partie de l'hydrogène sulfuré, qui se fait toujours sentir chez les colonies non recouvertes. Bien que ce procédé fasse se fusionner aisément un certain nombre des colonies, il est cependant à recommander d'examiner de cette manière une partie de la plaque de culture. C'est seulement quand les colonies sont capables de sécréter des acides que la croissance s'arrête, parce qu'il prend naissance des sels de plomb solubles et vénéneux. Cette sécrétion d'acides s'observe p. ex. quand les plaques renferment du sucre. L'acide carbonique toutefois n'a pas d'influence nuisible sur le phénomène.

L'ensemencement direct, p. ex. d'eau de canal diluée sur une plaque au blanc de plomb, fournit un résultat aussi simple que facile à embrasser. On reconnaît immédiatement qu'un grand nombre d'espèces bactériennes produisent des sulfures. Il y a surtout un groupe d'espèces qui par sa généralité mérite spécialement l'attention, c'est le groupe des bactéries de fermentation anaérobies temporaires (facultatives) proprement dites, parmi lesquelles le *B. coli commune,* tant par son abondance que par l'intensité de la production de sulfure, occupe le tout premier rang. Vient ensuite dans l'échelle le *B. lactis aërogenes,* un peu plus rare, mais toujours encore bien commun, qui se rattache par une série de formes intermédiaires, également ferments énergiques et producteurs actifs de sulfures, au *B. coli commune.*

Bien que ces bactéries se rencontrent aussi très généralement dans le sol des jardins et la terre arable, et résistent à la dessiccation, je crois cependant qu'elles sont capables de *se multiplier* suffisamment dans la vase et l'eau des canaux des villes pour pouvoir être considérées comme appartenant à la »flore aquatique«.

Si l'on examine des quantités suffisantes d'eau de canal au moyen de l'expérience au blanc de plomb, on s'aperçoit qu'un grand nombre d'autres espèces encore sont de réels producteurs de sulfures; beaucoup d'entre elles forment même individuellement encore plus de sulfure de plomb que le *B. coli commune* lui-même. Cependant il résulte de leur dispersion relativement faible, qu'ils n'ont qu'une importance secondaire au point de vue de la production totale d'hydrogène sulfuré. Beaucoup de ces organismes proviennent de la terre, et ont été emportés par la pluie dans les cours d'eau; ils appartiennent donc en réalité à la flore terrestre.

Je me rends, comme je l'ai dit, parfaitement compte du fait que bien des formes microbiennes ne se développent pas sur les plaqes au blanc de plomb; je n'ai pu p. ex. jamais y rencontrer les spirilles, qui ne croissent que très mal même sur les plaques ordinaires à l'extrait de viande, sans plomb. Cependant on ne peut douter que les bactéries de fermentation proprement dites, anaérobies temporaires, prennent une part prépondérante à ce processus. Comme il ne s'agit ici que d'un groupe de formes nettement délimité qui se distingue également par une série d'autres caractères, il

semble tout indiqué de les réunir en un genre commun *Aërobacter.* Je crois établir par là un genre réellement naturel, dont les représentants possèdent une parenté généalogique très proche. C'est donc tout autre chose que la désignation de *Photobacter,* que j'avais antérieurement choisie comme un nom de »genre physiologique«, et où se trouvaient réunis au moins trois groupes de formes non alliées. C'est tout autre chose aussi que les »genres« *Bacillus, Bacterium, Sarcine,* etc., qui peuvent renfermer les formes les plus distinctes.

Avant de passer à la considération de ce genre nouveau, un mot encore sur les formes qui ne produisent pas de sulfure dans l'expérience au blanc de plomb. Parmi ces formes le *Bacillus fluorescens liquefaciens* attire tout d'abord l'attention, tant par sa présence générale dans l'eau des canaux que par le développement abondant des colonies. Aussi la plupart des variétés du *B. fluorescens non liquefaciens,* de même que l'espèce précedente très généralement répandues dans l'eau de canal, ne produisent-elles pas de sulfure ou très peu. Cependant je ne crois guère que ces bactéries appartiennent à la flore aquatique ordinaire, car elles ont un tel besoin d'oxygène qu'elles ne trouvent dans l'eau que relativement peu l'occasion de se multiplier. La majorité de ces bactéries sera probablement emportée par les pluies dans les cours d'eau, ce qui n'est pas à coup sûr le cas de l'*Aërobacter.* Une troisième espèce qui ne produit pas de sulfure, mais que je n'ai pas encore déterminée, et que je rencontre sur les »plaques au blanc de plomb« sous forme de colonies blanches molles, non liquéfiantes, de bâtonnets courts, est intéressante en ce qu'elle est peut être la bactérie la plus générale de la flore aquatique.

Mais revenons au genre *Aërobacter,* qui importe seul pour le reste de notre objet.

3. *Création du genre Aërobacter.*

Les *Bacterium coli commune* et *B. lactis aërogenes* ont été isolés en 1886 par Escherich de l'intestin des enfants à la mamelle; l'auteur en fit des espèces particulières [1]). Depuis lors un grand nombre d'ouvrages ont paru sur ces bactéries, surtout sur la première; et il est établi actuellement que les deux espèces se rencontrent sous de nombreuses variétés, en partie intermédiaires entre les deux types. J'ai encore appris à connaître par observation directe quelques formes, qui diffèrent suffisamment des deux espèces ci-dessus pour faire admettre une distinction spécifique. D'autre part j'ai découvert de nouvelles séries de variétés qui relient entre elles d'une manière presque continue les espèces que je distingue, et aussi avec les deux espèces ci-dessus. J'ai donc acquis la conviction absolue des rapports de parenté dans ce groupe, que je considère comme très naturel, et qui se distingue si nettement des autres formes bactériennes que je crois indispensable de réunir les espèces et variétés en un genre commun et naturel, le genre *Aërobacter.*

Aërobacter. Des bactéries de fermentation anaérobies temporaires, adaptées aux solutions sucrées, et faisant fermenter le glucose, le lévulose, et communément aussi le saccharose, le maltose, le lactose, le galactose et la mannite en produisant de l'acide lactique ordinaire lévogyre et presque toujours aussi des gaz. Au point de vue des quantités de gaz formées aux dépens des diverses espèces de sucres, les différentes espèces

[1]) T. Escherich, Die Darmbakterien des Säuglings, Stuttgart, 1886, pp. 57 et 63.

se comportent différemment. Le gaz est un mélange d'anhydride carbonique et d'hydrogène, auquel vient s'ajouter une faible quantité d'hydrogène sulfuré, quand outre du sucre la nourriture renferme encore de l'albumine, du soufre ou des combinaisons peu oxygénées du soufre. Un trait caractéristique, c'est l'éclat nacré des cultures sur gélatine à l'extrait de viande ou au moût, éclat provenant de la présence de soufre libre. Les sulfates ne sont nullement réduits; mais toutes les espèces réduisent aisément les nitrates à l'état de nitrites, jamais à l'état d'ammoniaque. Les nitrates arrêtent complètement la fermentation même en faible quantité, sans cependant nuire au développement [1]). Le bouillon de viande et la gélatine au bouillon deviennent immédiatement alcalins, mais en présence de sucre seulement quand l'acide lactique formé est neutralisé par l'alcali. Les extraits végétaux où s'établit la fermentation de l'*Aërobacter* changent également leur réaction acide en alcaline. Toutes les espèces peuvent être rapidement desséchées sans être tuées. Il ne fut pas observé de sporulation; tout au moins la pasteurisation à 65° C. tue-t-elle toutes les espèces. Souvent on observe de la motilité, qui toutefois peut faire défaut. Chez l'*A. aërogenes* les cils sont distribués sur la surface entière (péritriche), chez l'*A. liquefaciens* il n'y a qu'un seul cil polaire (monotriche). Certaines espèces produisent beaucoup de trypsine; de la diastase n'est jamais sécrétée. L'invertine et la glucase semblent faire complètement défaut, de manière que le sucre de canne et le maltose sont directement fermentés (par voie cataboliste) [2]). Il s'accumule dans le corps bactérien du glycogène, quand il y a du sucre assimilable en présence; les bactéries se colorent donc en brun-violet foncé par l'iode. Les colonies récentes sur le moût gélatiné de l'*A. coli* var. *infusionum* se colorent fréquemment en bleu foncé par la teneur en granulose; mais cette réaction se modifie dans les transports successifs et passe à la réaction brune ordinaire du glycogène. Par ses rapports avec l'oxygène et la réaction du glycogène, l'*Aërobacter* rappelle vivement les vraies levûres alcooliques. Les meilleures sources d'azote sont la peptone et l'asparagine. Sur l'asparagine seule, sans source de carbone, il y a développement limité. La fermentation microbienne de l'indigo est due surtout à l'*Aërobacter*, malgré que dans des fermentations pareilles il y ait encore beaucoup d'autres espèces bactériennes en jeu mais qui n'ont qu'une moindre importance. Cette fermentation repose sur la décomposition de l'indican (le glucoside de l'indigo $C_{14} H_{17} NO_6 + 3 H_2O$), avec formation d'indoxyle ($C_8 H_7 NO$) et de glucose; en présence de l'air, l'indoxyle se transforme en bleu d'indigo ($C_{16} H_{10} N_2 O_2$), avec une grande intensité surtout en solution alcaline. Le glucose de l'indican, indépendamment de la présence de l'air, fermente avec production d'hydrogène et d'anhydride carbonique. Pour mettre cette fermentation en train, il est pratique de faire une décoction du *Polygonum tinctorium* ou de l'*Indigofera leptostachya*, plantes qui croissent assez bien dans nos jardins et renferment beaucoup d'indican; on infecte avec du sol ou de l'eau de canal [3]). Seule la forme isolée des

---

[1]) C'est là-dessus que repose l'emloi de salpêtre dans l'industrie fromagère, pour empêcher la formation de gaz par l'*Aërobacter* (en hollandais »rijzers«). Il suffit déjà de 0,05 % du poids de lait employé.

[2]) C'est-à-dire par action de contact du protoplasme vivant. Voir le tome précédent du présent recueil, pp. 338.

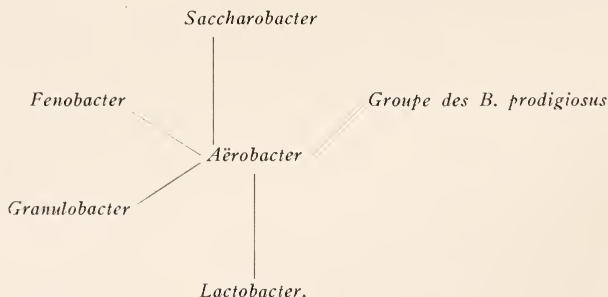
[3]) On trouve les détails sur la fermentation indigotique dans mon »Indigofermentatie«. *Versl. der Kon. Akad. v. Wetensch.*, Amsterdam 31 Maart 1900, p. 573.

matières fécales, l'*A. coli* var. *commune* n'agit que lentement ou n'agit pas du tout sur l'indican, et peut ainsi être distinguée des autres espèces et des variétés affines. La décomposition de l'indican est un phénomène de catabolisme, c'est-à-dire qu'il n'est pas mis en train par un enzyme particulier, de manière que les bactéries mortes sont inactives.

L'optimum de température pour la croissance de l'*Aërobacter* est situé vers 28° C. A 37° C. la croissance est fortement diminuée ou même complètement arrêtée.

Pour le diagnostic des espèces, la culture sur moût gélatiné avec ou sans indican est spécialement à recommander. Pour déterminer la manière très diverse dont les espèces et variétés se conduisent envers les sucres, il est bon de dissoudre environ 8% de ceux-ci dans de l'eau de levûre et d'examiner ce qui se passe dans les »tubes de fermentation«.

Les genres alliés sont, parmi les aérobies, d'une part les bactéries du foin *(Fenobacter)* et les bactéries du sucre *(Saccharobacter,* auxquelles appartiennent les diverses formes de *Bacillus megatherium* et *B. hortulensis),* d'autre part le groupe des *B. prodigiosus* (dont la délimitation générique me paraît encore incertaine); parmi les anaérobies les ferments butyriques (*Granulobacter*). Moins étroitement alliés sont les ferments lactiques proprement dits, qui appartiennent tous [1]) au genre naturel *Lactobacter.* Ces parentés peuvent être exprimées schématiquement comme suit:



Les espèces les mieux étudiées sont les suivantes:

1. *Aërobacter aërogenes (= Bacillus lactis aërogenes* Escherich). Bâtonnets de longueur très diverse, parfois extrêmement courts et en forme de micrococques; rarement mobiles et dans ce cas péritriches. Cette espèce forme sur moût gélatine de grandes colonies blanches ou jaunes, molles (non visqueuses) qui ne liquéfient la gélatine qu'au moment de mourir ou ne le font jamais. De nombreuses variétés, que l'on peut obtenir p. ex. par l'expérience d'accumulation suivante. Du seigle moulu, mélangé d'eau distillée, de manière à donner une bouillie épaisse, est abandonné à 28° C. dans un gobelet de vere [2]). Au bout de 12 heures il s'y fait une fermentation extrêmement abondante d'*aërogenes,* qui, transportée sur moût gélatiné, fournit soit à l'état pur soit en mélange avec diverses variétés de l'*A. coli,* les variétés principales

[1]) Les bâtonnets comme les diplococques et les micrococques.

[2]) A 37° C. ou obtient par la même expérience une fermentation butyrique exempte d'*Aërobacter* mais de même allure, et suivie aussi des *Lactobacter.*

de l'*A. aërogenes.* Si l'on prolonge la fermentation, il s'y développe des ferments lactiques *(Lactobacter),* qui supplantent les formes de l'*aërogenes.* Les infusions végétales, ensemencées de terre, peuvent fournir également par transport répété une accumulation de cette forme, même une culture pure. Cette forme se rencontre aussi très généralement dans le lait, surtout dans le lait un peu acide, mais pas trop vieux; aussi dans le sol, dans l'eau et dans la vase des canaux. Elle fait fermenter aussi bien le saccharose que le lactose, le maltose et la mannite avec grande intensité.

2. *Aërobacter viscosum.* Ressemble à l'espèce précédente, mais forme des colonies extrêmement variées sur le moût gélatiné et les substratums au saccharose; appartient par suite aux bactéries mucigènes les plus typiques. Fermentation active dans le moût et les autres solutions sucrées, tant celles de saccharose que de maltose et de lactose. Consiste en diplococques ou courts bâtonnets avec accumulation de glycogène aux pôles, non au centre; par suite il n'y a qu'un faible brunissement par l'iode. Est immobile. Fut isolé des fermentations d'*Aërobacter* ci-dessus mentionnées, quand on faisait usage de seigle, provenant du Danube ou de la Mer noire; jamais aux dépens de seigle des pays du Nord ou des Pays-Bas.

3. *Aërobacter coli.* Cette espèce comprend un grand nombre de variétés, isolées en partie des excréments, surtout de mammifères, en partie aussi des eaux ménagères et des canaux des villes. La variété la mieux connue est *l'A. coli* var. *commune* Escherich. La forme provenant des excréments humains est assez bien caractérisée par son très faible pouvoir de décomposer l'indican, et la production d'une matière colorante jaune dans les cultures sur pomme de terre. Sur le moût ou le bouillon gélatinés prennent naissance les colonies plates bien connues, découpées sur les bords, transparentes comme du verre. Produit de l'hydrogène, de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène sulfuré dans les solutions de moût. C'est le sujet des travaux si étendus et embrouillés sur le *coli*-bacille. Certaines variétés ne produisent pas de gaz dans le moût et se laissent alors facilement confondre avec l'organisme du *typhus,* dont ils diffèrent toutefois essentiellement [1]).

A. coli var. *infusionum* [2]). Se développe sur le moût et le bouillon gélatinés de la même manière que l'*A. coli* var. *commune,* avec lequel on confond souvent la présente variété. Elle est toutefois plus robuste et bien plus riche en glycogène, ce qui fait que les colonies sur moût gélatiné se colorent en violet-brun foncé par l'iode, même bleu pur dans beaucoup de cas, comme il a déjà été dit à propos du diagnostic du genre. Se rencontre surtout très généralement dans les eaux de déchet des fabriques de sucre de canne et dans les infusions végétales, dans l'eau de rouissage du lin, dans les eaux ménagères, dans le lait en compagnie de l'*A. aërogenes,* dans les fermentations spontanées de la farine. Cette variété de l'*A. coli* est avec l'*A. aërogenes* la bactérie la plus importante de la fermentation de l'indigo, et peut donc être aisément accumulée dans les décoctions d'*Indigofera leptostachya* et *Polygonum tinctorium,* qui sont ensemencées au moyen d'un peu de terre, et transportées à plusieurs

---

[1]) Le *Bacillus typhoïdes* appartient à mon avis à un tout autre genre, auquel il faut rapporter aussi le *Bacterium zopfii* Kurth.

[2]) Bien que je croie cette forme suffisamment caractérisée, pour lui donner le rang d'espèce, la bibliographie me conduit à la subordonner provisoirement comme variété au *coli.*

reprises. C'est en quelque sorte la forme originale du groupe *Aërobacter,* ce qui résulte de ce que des cultures vieillies d'autres espèces (telles que celles d'*A. aërogenes* et *A. viscosum)* produisent parfois par atavisme des colonies, qui ne se laissent pas distinguer de l'*A. infusionum.*

4. *Aërobacter liquefaciens.* Cette espèce liquéfie avec une grande intensité la gélatine au moût ou au bouillon, et appartient aux agents de fermentation les plus énergiques à l'égard du moût. Ce sont de courts bâtonnets doués d'une grande motilité, munis d'un cil polaire, difficile à colorer. Ils se rencontrent assez rarement dans la vase des canaux, généralement dans certains marécages. Voici comment je les ai obtenus. Des rhizomes secs, achetés dans une pharmacie, d'*Althaea officinalis,* furent coupés en morceaux, recouverts d'eau, et abandonnés à eux-mêmes pendant une couple de jours à 28° C., dans une éprouvette de verre. Il prend naissance un mucilage épais, entrant en fermentation violente, laquelle fournit à côté de plusieurs variétés d'*A. aërogenes,* surtout l'*A. liquefaciens,* quand on ensemence sur du moût gélatine. J'ai trouvé parfois la même forme dans les fermentations d'indigo ci-dessus décrites après infection avec du terreau de jardin. Le pouvoir fermentatif est comme chez l'*A. aërogenes.*

Ce qui a encore une grande importance pour la distinction des espèces et variétés les unes des autres, c'est le degré de fermentation et de croissance en présence des principaux sucres. Le tableau suivant donne la valeur relative de ces deux fonctions, dans de l'eau de levûre additionnée de 8% des sucres correspondants, à 28° C.

La valeur relative de la croissance a été déterminée »colorimétriquement«, c'est-à-dire d'après le trouble apparent des cultures. La valeur de fermentation est fournie par le nombre de centimètres cubes de gaz (mélange d'anhydride carbonique et d'hydrogène) qui ont pris naissance en 36 heures environ aux dépens de 25 cm.³ du liquide nutritif ci-dessus.

Le résultat le plus intéressant qui se dégage de ce tableau au point de vue physiologique, c'est le fait que le développement et la fermentation ne s'élèvent ni ne s'abaissent nullement toujours ensemble, ce qui est surtout remarquable chez l'*A. viscosum* pour le saccharose, le maltose et le lactose. Le lévulose donne également lieu à des observations importantes.

	Lévul.		Glucose		Sacchar.		Maltose		Lactose		Galact.	
	Ferment.	Développ.	Ferment.	Développ.	Ferment.	Développ.	Ferment.	Développ.	Ferment.	Développ.	Ferment.	Développ
1. *A. aërogenes*	5	9	10	9	4	10	10	5	5	5	2	7
2. *A. viscosum*	5	8	10	8	9	9	10	5	1	5	4	8
3*a*. *A. coli var. commune* [1]) .	2	4	2	3	2	2	1	4	1	4	2	4
3*b*. *A. coli var. infusionum* [2]) .	3	6	10	8	7	8	2	2	1	3	5	5
4. *A. liquefaciens*	2	7	8	8	5	8	1	3	1	2	2	6

[1]) Isolé d'excréments humains.

[2]) Isolé du lait.

4. *Aux dépens de quels corps l'Aërobacter produit-il de l'hydrogène sulfuré? Origine de l'odeur de putréfaction.*

L'expérience »au blanc de plomb«, telle qu'elle a été décrite antérieurement, s'applique exclusivement à la production de sulfure aux dépens d'albuminoïdes. Ceci se reconnaît à ce que les plaques au blanc de plomb privées d'albuminoïdes, même quand elles renferment des sulfates, fournissent, ensemencées avec l'*A. coli* ou d'autres espèces, des cultures complètement incolores. De même, c'est la décomposition des albuminoïdes qui doit expliquer le brunissement bien connu du papier à l'acétate de plomb, suspendu dans le col de ballons renfermant du bouillon ou du moût de bière, et ensemencés d'*Aërobacter*. Il est curieux que les sulfures formés à cette occasion ne répandent pas d'odeur désagréable. Cela résulte de l'observation suivante. Quand on ensemence au moyen d'eau de canal du bouillon de viande, et qu'on cultive en présence d'une quantité limité d'air, mais non en son absence complète, il se forme des cultures d'odeur extrêmement nauséabonde, qui brunissent fortement un papier de plomb suspendu au-dessus. Cette odeur ne change en aucune manière quand on ajoute du blanc de plomb au liquide de culture, malgré que le sel de plomb se colore en brun foncé, et absorbe si complètement tous les sulfures que le papier de plomb, suspendu dans le col du ballon, demeure complètement incolore. Il résulte de ceci que ce ne sont pas les sulfures qui produisent l'odeur de putréfaction nauséabonde, et que dans tous les cas les émanations des canaux ne peuvent provenir d'hydrogène sulfuré.

Is est d'autre part certain que ces corps nauséabonds, tout comme les sulfures eux-mêmes, se forment aux dépens des matières protéiques; car les solutions qui renferment de l'asparagine, du glucose, du soufre et du phosphate de potassium, et qui après l'ensemencement au moyen d'*Aërobacter coli* mettent en liberté une grande quantité d'hydrogène sulfuré, dégagent une odeur plus agréable que désagréable. Quoique je soupçonne que les corps odorants sont des produits de décomposition phosphorée des matières albuminoïdes, je n'ai pu cependant me convaincre de l'exactitude de cette opinion. Je n'ai toutefois jusqu'ici fait que des expériences préliminaires au moyen de papier d'argent. L'*Aërobacter* n'a aucune part à leur production; ces corps sont surtout sécrétés par des vibrions et des spirilles, en partie aussi par des anaérobies.

Une excellente solution nutritive pour toutes les espèces d'*Aërobacter*, complètement exempte de matières protéiques, se prépare comme suit. A 100 cm.^{3} d'eau distillée ou d'eau de canalisation on ajoute 0,5 gr. d'asparagine, 3—10 gr. de glucose, 0,01 gr. de KH_2PO_4 et 0,01 gr. de $MgSO_4$. On remplit de cette solution des ballons jusqu'au col, et l'on ensemence au moyen d'une espèce quelconque d'*Aërobacter*. Il se développe alors vers 30° C., en 12—18 heures, une vive fermentation, dans laquelle prennent naissance de l'hydrogène et de l'anhydride carbonique; en même temps il y a développement énergique. Ajoutant du blanc de plomb, ce sel demeure incolore de même qu'un papier de plomb suspendu au-dessus, ce qui montre le sulfate n'est pas réduit.

Mélangée d'agar exempt d'albuminoïdes, cette solution peut être employée à la préparation de plaques au plomb sans albumine. Pour enlever l'albumine de l'agar du commerce, il faut l'extraire longtemps avec de l'eau, renfermant un peu de nourriture

bactérienne, p. ex. des traces de glucose, de phosphate et d'asparagine, tandis que le tout reste exposé à une infection spontanée. Les bactéries protéolytiques qui s'y fixent en masse décomposent complètement l'albumine de l'agar, et les produits de décompositon peuvent être finalement enlevés par lavage à l'eau distillée. Une pareille préparation, contrairement à l'agar du commerce, ne donne plus lieu du tout à la formation de sulfure [1]).

Les milieux de culture liquides et solides préparés de cette manière ne dégagent pas d'acide sulfhydrique, ni sous l'action de l'*Aërobacter,* ni sous celle des autres bactéries ordinaires parce que ce ne sont pas elles qui peuvent réduire les sulfates. Cet état de choses ne change pas, quand on tâche, par l'addition d'autres matières nutritives exemptes d'albuminoïdes, d'améliorer la solution, ou bien d'y créer des conditions vitales plus défavorables en diminuant ou supprimant certaines des substances mentionées.

Les mélanges nutritifs préparés comme ci-dessus sont donc propres à déterminer la nature du corps aux dépens desquels l'*Aërobacter* et d'autres bactéries communes sont capables de dégager de l'acide sulfhydrique. J'ai fait dans ce sens de nombreuses expériences; les corps suivants, outre les albuminoïdes, ont été reconnus spécialement propres à la formation de sulfures par l'*Aërobacter.*

Il faut citer ici en premier lieu le soufre. J'ai fait usage du soufre précipité des pharmacies, de la fleur de soufre ordinaire et de soufre très finiment divisé, obtenu par oxydation d'hydrogène sulfuré au moyen de peroxyde d'hydrogène. J'ai ajouté ces substances, ou bien à la solution d'asparagine et glucose, ou aux plaques à l'asparagine, glucose, agar, et blanc de plomb, mais privées d'albuminoïdes. Les substratums bouillis furent ensemencés de diverses espèces d'*Aërobacter* et de variétés des mêmes espèces, provenant de ma collection. Je suspendis au-dessus des solutions, dans le col des ballons, du papier de plomb. Au bout de 12 heures la réaction était déjà très nette; le papier de plomb au-dessus des solutions nutritives s'était noirci. Les stries d'inoculation sur les plaques d'agar au blanc de plomb s'étaient brunies. C'est surtout la forme isolée des matières fécales, c'est-à-dire *A. coli* var. *commune,* qui agit d'une manière très intense. L'*A. coli* var. *infusionum* suivit un peu plus tard, et l'*A. aërogenes* ne se colora que très peu dans les plaques au plomb, probablement parce que cet organisme ne peut dissoudre qu'une petite quantité de soufre; dans le liquide au contraire il était très actif. En résumé, le soufre a été reconnu comme une des meilleurs sources d'hydrogène sulfuré de nature bactériogène. L'expérience est entièrement analogue à la formation d'acide sulfhydrique aux dépens de soufre, telle qu'elle a été mentionnée ci-dessus, quand on introduit du soufre dans une solution de sucre en fermentation alcoolique. Sur quel phénomène chimique cette transformation repose-t-elle? C'est ce qui n'est pas encore clair. Il faut admettre qu'un peu de soufre se dissout dans le liquide en fermentation, et pénètre à l'état dissous dans la cellule de levûre ou le corps bactérien. Il n'est assurément pas permis de supposer que la transformation du soufre a lieu en dehors des cellules. L'hydrogène libre, qui se rencontre dans les cultures d'*Aërobacter,* ne peut jouer un rôle dans le processus; cela est précisément exclu par l'expérience avec la levûre alcoolique en culture pure, puisque l'hydrogène libre y faire complètement défaut.

[1]) Réciproquement il n'y a pas de procédé plus élégant pour démontrer dans l'agar du commerce la présence d'albuminoïdes, que l'expérience au blanc de plomb.

Outre le soufre, il y a encore une autre série de corps qui, dans les cultures au glucose et à l'asparagine, donnent, ensemencées d'*Aërobacter,* de l'hydrogène sulfuré avec une grande facilité, ce qui se démontre aussi au moyen d'un papier à l'acétate de plomb suspendu au-dessus. Ces corps sont les combinaisons peu oxygénées du soufre, parmi lesquelles j'ai examiné l'hydrosulfite de Schützenberger ($SO_2 Na$), le sulfite l'hyposulfite, le tétrathionate et le pentathionate, tous à l'état de sels de sodium. Comme ces sels ne nuisent que fort peu à la croissance de l'*Aërobacter,* on peut leur présenter des quantités qui s'élevent p. ex. à 0,1—0,5% de la solution, ce qui suffit amplement à rendre visible la transformation en acide sulfhydrique en 12 heures ou moins. On dispose les expériences comme dans le cas du soufre. Le sel est introduit dans la solution bouillante d'asparagine et de glucose, rapidement refroidie dans le cas du sulfite de sodium, qui s'oxyde facilement à l'air à l'état de sulfate, et ensemencée d'*Aërobacter.* On suspend un papier de plomb au tampon d'ouate dans le col du ballon, et on met à l'étuve à 30°. Pour les sulfites qui s'oxydent si facilement à l'air, il faut empêcher l'accès trop libre de l'oxygène, ce qu'on peut réaliser dans les ballons ordinaires en les remplissant jusqu'au col. C'était surtout la transformation facile et rapide du sulfite de sodium en hydrogène sulfuré qui m'intéressait, attendu que ce corps, en solution légèrement acide, est certainement vénéneux. On doit donc se demander si le phénomène entier de la production d'acide sulfhydrique par l'*Aërobacter* et les autres bactéries n'a pas pour but de faire disparaître des solutions ces sels du soufre, qui leur sont à plus d'un point de vue nuisible.

Tout comme on l'a vu quand on se sert de soufre pur, les espèces du genre *Aërobacter* concordent complètement avec la levûre alcoolique dans leur relations avec les combinaisons peu oxygénées du soufre, car j'ai déjà démontré antérieurement que ces corps, surtout les sulfites et les thiosulfates, sont transformés en acide sulfhydrique avec une grande facilité aussi dans les fermentations alcooliques des sucres [1]).

Le sulfure formé par l'*Aërobacter* est retenu en partie à la surface ou dans l'intérieur des corps des bactéries. Cela résulte des faits suivants, qui ne manquent pas d'intérêt. Quand dans une capsule de porcelaine on met un peu d'iodate de potassium (KIO_3), que l'on additionne d'un peu d'empois d'amidon et que l'on acidule légèrement, puis qu'on y introduit au moyen d'une spatule de platine un peu de matériaux d'ensemencement provenant de cultures d'*Aërobacter* (de préférence les *A. coli* et *A. aërogenes* cultivés sur bouillon ou moût gélatinés), l'iodate est réduit par le sulfure renfermé dans le corps bactérien, avec dépôt d'iode et bleuissement de l'amidon. Il ne s'agit pas ici simplement de dégagement d'hydrogène sulfuré aux dépens des albuminoïdes protoplasmiques des corps bactériens. Je déduis ceci de ce que la levûre de bière et le blanc d'oeuf coagulé réduisent l'iodate avec une intensité beaucoup

[1]) Ainsi se trouve aussi suffisamment réfutée la »nouvelle théorie« de la formation d'acide sulfhydrique aux dépens de sulfates, de M. le professeur Saltet (*Handel. van het 7e Natuur- en Geneesk. Congres te Haarlem,* p. 378. Haarlem, 1899) et de M. C. Stokvis (Bijdrage tot de verklaring van de zwavelwaterstofvorming in het Amsterdamsche grachtwater. Amsterdam, 1899). Ces messieurs admettent que le *coli* réduit les sulfates à l'état de sulfites ou d'autres combinaisons peu oxygénées du soufre, ce qui n'est pas exact; et pensent que d'autres espèces bactériennes réduisent ces combinaisons du soufre à l'état d'hydrogène sulfuré, ce qui précisément pourrait être fait par le *coli.* Afin de contribuer pour leur part à la confusion qui existe actuellement dans la nomenclature bactériologique, les auteurs nomment le *coli* »*Bacillus desulfuricans*«.

moindre; mais plus encore de l'expérience antérieurement décrite, qui semble montrer que l'*A. coli* et l'*A. aërogenes* peuvent être cultivés en solutions privées de soufre, et pourraient donc être constitués de protoplasme exempt de soufre. Ce qui concorde avec ceci, c'est que des cultures vigoureuses de l'*A. coli*, cultivées sur les milieux à l'agar décrits ci-dessus, privés d'albuminoïdes, ne colorent pas en bleu une solution d'iodate à l'amidon. D'ailleurs l'iodate est décomposé aussi bien par le sulfure d'ammonium et l'hydrogène sulfuré que par toutes les autres combinaisons peu oxygénées du soufre ci-dessus décrites, mais le plus difficilement par les sulfites, dont il constitue cependant le réactif classique. Des corps bien plus énergiquement réducteurs sont au contraire le sulfure d'ammonium, le thiosulfate, le tétra- et le pentathionate.

Je considère néanmoins comme hors de doute que ce ne sont pas ces trois derniers corps, mais seulement les sulfures qui prennent part à la réduction de l'iodate ici en question. La réduction directe de l'iodate à l'état d'iodure de potassium, qui en présence de l'iodate non encore décomposé, après addition d'acide, peut mettre en liberté de l'iode et colorer l'amidon en bleu, est ici exclue. Je n'ai pu démontrer ce processus chez les bactéries; je l'ai observés seulement chez quelques levûres, mais à un degré faible et irrégulier.

Conclusions.

Le genre *Aërobacter* dont la création est ici proposée, est composé des bactéries communes des fermentations des sucres, avec production d'hydrogène, d'anhydre carbonique et d'acide lactique lévogyre. L'espèce et la variété la plus connue est l'*Aërobacter coli* var. *commune* du corps humain.

C'est bactéries sont les principaux agents de la formation d'hydrogène sulfuré aux dépens des corps albuminoïdes, du soufre, des sulfites et des thiosulfates, ce qui a été étudie au moyen des plaques au »blanc de plomb« et par des expériences avec des cultures liquides.

Ils ne produisent pas d'hydrogène sulfuré aux dépens des sulfates, qu'ils ne peuvent pas réduire, l'agent de cette réduction étant le *Spirillum desulfuricans*.

Les corps nauséabonds qui se développent dans les eaux ne sont pas de sulfures.

23 janvier 1900.

On different forms of hereditary variation of microbes.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. III, 1900, blz. 352—365. — Verscheen onder den titel »Over verschillende vormen van erfelijke variatie bij mikroben« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel IX, 1900, blz. 310—324, en onder den titel »Sur diverses formes de variation héréditaire chez les microbes« in Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome IV, 1901, p. 213—230.

The interesting lecture of Prof. Hugo de Vries in the last meeting of the Academy on the origin of new forms in higher plants, induces me to draw attention to some observations regarding the same subject in microbes.

Though the culture of microbes, compared to that of higher plants and animals is subject to many difficulties, it cannot be denied that, these once mastered, microbes are an extremely useful material for the investigation of the laws of heredity and variability. The starting from the single individual, which of course is required here, is commonly almost as simple as for the higher organisms, and it is want of practice only which makes it appear so troublesome. The generations succeed each other quickly; hundreds, nay thousands of individuals can be very easily surveyed in their posterity; far remote classes of the natural system are represented by microbes; in many the variability is great [1]). Even the difficulty of determining the species and varieties, which is frequently only possible by means of biochemical investigation, can become an advantage, for the very reason that biochemical methods of distinction are very accurate, can be extended in various directions and compared by measurement. Thus the species and varieties of lactic-acid ferments are distinguished by titration, alcohol ferments by means of the saccharometer, while different carbohydrates can be selected as the base of lactic-acid and alcohol fermentation. To all this is added the circumstance that it is easy to perform with microbes experiments of competion, which is difficult or impossible with higher plants and animals, and it is well-known how delicate the distinctions are which are thereby revealed.

In comparing the results obtained with microbes to the rules found in higher organisms, account should be kept, first, with the want of sexuality, by which the variation of microbes becomes comparable to the bud-variation of the higher plants, and, second, with the unicellularity of the microbes. As to the first point the experiences with the bud-variants of higher plants seem to prove that an essential difference between bud-variation and seed-variation does not exist. As to the uni-

[1]) Compare Rodet, De la variabilité dans les microbes, Paris 1894. Bibliography wants in this book and not all data are trustworthy.

cellularity of the microbes, it is my opinion that by it the phenomena of variation are rendered clearer but are not changed, when compared to the multi-cellular organisms. According to the point of view, the individual microbe can be compared to the whole individual of the higher organism, or to a single tissue-cell oft it, — both comparisons are correct [1]).

1. *Degeneration.*

In bacteriological laboratories it is well-know that by prolonged culture many microbes undergo slow, but great changes, even in so much, that certain long continued cultures do not agree any more with the descriptions given of them by the discoverers, short after their first isolation from nature. In some cases the way in which the change takes place can be rather minutely traced; three forms of variability are therein more salient: degeneration, transformation and common variation.

A species is isolated from nature and it is found that at the culture during the first series of inoculations, in which hundreds or thousands of cell-generations succeed each other, it develops well, so that in the beginning the impression is obtained of a thorough knowledge of the nutrition and other conditions of life. But by and by it becomes more difficult to make the new inoculations thrive and at last the culture-material grows troublesome and uninteresting and would be quite unrecognisable if not the various phases of the degeneration-process had been exactly observed. Prolonged cultivation above the optimum temperature of the growth, and a too strong concentration of the nutriment are in some cases the cause of degeneration. In some microaërophilae, for instance the bactery of the »lange-wei« *(Streptococcus hollandiae)* [2]), the irrational regulation of the oxygen tension causes a rapid, in few days complete vanishing of the slimeformation, while after a much longer time, by the same cause, the vegetative power of the bactery completely disappears. In other cases, for instance with a phosphorescent bactery, very common in the sea *(Photobacter degenerans* Fischer), the degeneration is accomplished without known cause, and in a very short time, so that, within a few weeks the cultures may cease to exist. The degeneration goes not by leaps but continously and affects all the individuals in culture equally, so that it cannot be checked by colony-selection.

2. *Transformation.*

At the transformation all the individuals brought in culture lose a characteristic, while either another comes in its place, or a new characteristic arises, or, lastly, the characteristic disappears without a distinct substitute. Thus the cultures of *Photobacter luminosum* grow dark in the course of some months by a slow process of transformation, whereby they change into a more rapidly growing form, which acts more strongly on the nutriment than the normal form. Here, thus increase of vegetative power has supplied the decrease of phosphorescence.

---

[1]) An interesting view herewith connected is found in Whitman, The inadequacy of the cell-theory of development. Biological Lectures at the Wood's Holl Laboratory, 1893, pag. 105, Boston 1894.

[2]) Used in Holland for cheese-making.

It is remarkable that the transformation in this phosphorescent bactery sometimes suddenly ceases and is replaced by a process of variation where, beside a completely dark form (the variant), the phosphorescent form with the full primitive phosphorescent power again springs up. This is not the same as common atavism, where the stock which throws off the atavist does not change further, but it is probably comparable to the splitting of a bastard into the two components. Very slow cell-partition, caused for instance by culture at a low temperature, furthers this phenomenon. On the other hand, the cause of the transformation may be a too rapid process of cellpartition in which the photoplasm, which seems to grow more slowly than the rest of the protoplasm, remains behind in its development.

In another phosporescent bactery of the sea, common on our coast, *Ph. hollandiae,* I hitherto only saw transformation, so that this species quickly disappears from the cultures as a phosphorescent bactery.

In a pigment bactery *(Bacillus viridis)* I saw, apparently without any other change, the at first very strong power of liquefying gelatin, by and by get lost in all the individuals.

On the other hand, I have seen in some vibrions, in a corresponding way, from non-gelatin-liquefying individuals come forth liquefying ones.

The new forms, thus called into life give, at superficial examination, quite the impression of new constant species. They cannot, however, be valued as such as they differ only by one or very few characteristics from the mother forms. This is the cause why they must be classified as variants, quite like those of the following case.

3. *Common variation.*

The third and most frequent form of variability is *common variation.* Here the normal form continues unchanged, but now and then throws off individuals, the variants, which, from the beginning, are likewise constant and remain so, but which every now and then again throw off other variants, among which the normal form may occur as an atavist. These variants probably correspond with many well-known so-called varieties or races of culture plants and domestic animals, and likewise, I should think, with the interesting new forms obtained by Prof. de Vries from *Oenothera lamarckiana* [1]). They remind us in some respects also of the Pleomorphy in the Fungi, which especially in the Ustilaginae, can easily be observed in the laboratories and about which, in particular Brefeld, has made many researches [2]).

The names variant and sub-variant I have chosen, because in the here discussed products of hereditary variation, which differ apparently very much, but in fact only little from the normal form, I think to see the lowest degrees of the natural system following above the individual, and to them are given those names according to the rules of botanic nomenclature [3]).

---

[1]) These Proceedings. Meeting of 29 Sept. 1900 pag. 246. Comptes rendus. T. 131 pag. 124 en 561, 1900.

[2]) Botanische Untersuchungen über Hefenpilze. Heft 5, 1883.

[3]) A. De Candolle, Lois de la nomenclature botanique, 2e Ed. pag. 15, 1867, and Nouvelles remarques, pag. 48 and 63, 1883.

Regarding the divisions above the species, de Candolle does not think it necessary to give definitions, in which I quite agree with him. But singularly enough he does try to do it for the ranks beneath the species, where he takes the greater or lesser constancy at sowing as a criterion for the differences. This is not logical, here too, definitions are unnecessary.

Probably various causes give rise to the production of variants. Lengthened growth at insufficient nutrition, and the prolonged action of the own secretion products of the microbes may, with some probability, be considered as such causes.

The variant seems seldom, perhaps never, by one single cell-partition to result from the mother-form, but only after some intermediary partitions, rapidly accomplished. With these latter partitions correspond the sub-variants, with a disposition for atavism or further variation, and only keepable by colony-selection.

I will now describe some instances of common variation; first a few cases of the originating of hereditary-constant variants, which seem unable to return to the stock, then the more complicated case of constant and variable variants, among which some with a great disposition for atavism, which case I have nearer investigated in the West-Indian phosphorescent bactery and its relatives.

I might augment these instances with many more, for most of the microbes with which I occupied myself for a length of time, produced in my cultures more or less hereditary-constant variants. Extremely variable are the mycelia of the Fungi, for which I refer to the complicated relations of the aethyl-acetate-yeast, which I described and demonstrated in 1895 [1]), and where transformation and common variation both occur.

4. *Variation in Schizosaccharomyces octosporus* [2]).

This curious maltose-yeast I detected in 1893 on dried orient-fruits as currants, dates, raisins, and figs. I found a good method to separate this species from the other microbes, by which it is possible as often as desired to bring it from nature into culture. It proved to be a generally spread organism, which is found in Greece, Turkey, Italy, Asia Minor and Java in one and the same variety. After many isolations I found in 1897 [3]) a new variety on dates from N.-Africa. The culture is effected in the like way as of beer-yeast on wort-gelatin. Maltose, like glucose and levulose, undergoes a vigorous alcoholic fermentation, cane-sugar not at all.

As well the usual form as the new variety produce 8-spored sporangia, the spores of which colour intensely blue with iodium. During the growing a small quantity of diastase is secreted. The vegetative condition which precedes the spore-formation, as also the vegetative variant, which produces no more spores, of which more below, multiply by partition (not as in other yeasts by budding) and colour yellow by iodium; glycogene wants completely in it. Accordingly it is possible, by treating a culture with iodium, from thousands of colonies, instantly to recognise those containing spores, and from the intensity of the blue-colouring with some certainty to make out

[1]) Handelingen van het 5e Natuur-en Geneesk. Congres te Amsterdam pag. 301, 1895.

[2]) Centralblatt für Bacteriologie Bd. 16 pag. 49, 1894 and Ibid. Abth. 2. Bd. 3 pag. 449, 1897. In 1897 I put the variant on a level with a »vegetative race«, but as I now think, in doing so I rated its systematic value too high.

[3]) Together with a new quite different species of *Schizosaccharomyces*.

the number of spores present. The variety of dates differs from the main form by the sporangia of the latter being ellipsoidal and thickest in the middle, while in the variety, on the other hand, they are just in the middle constringed, and moreover by several other little salient characteristics, which only become discernible by practice.

Both, main form as well as variety produce, as the cultures grow older, a variant so much deviating from the normal forms, that, if these variants were met with in nature, they would certainly be proclaimed a new species if no new genus. The cells are globular, and not as in the normal form elongated, but the multiplication is here also exclusively effected by partition. Spores are not at all formed.

This variant springs, so far as I have been able to find out till now, at once form the normal form, which for the rest propagates unchanged, and can constantly anew throw off the variant. The first variants are found in cultures which have continued growing a few weeks without re-inoculating, and they go on some time multiplying on the nearly exhausted culture medium, after the normal form does no more do so. This points to a gain of vegetative power, at least in the conditions that prevail in the old culture-medium, but in new nutriment I could observe nothing of this difference.

The variant after repeated re-inoculation, at present already during more than three years and consequently after thousands of cell-generations, has remained perfectly constant; never could even a single sporangium be found, which, with the help of the iodium reaction, can be seen at a glance in the microscopic preparation. Whether in the variant the faculty of forming spores continues latent is possible, even probable, but not proved.

In the variety, isolated from dates, also occur sub-variants, that is intermediary forms between normal form and variant, while in that of currants I have found no sub-variants. The sub-variants still produce some sporangia, mostly 8-spored. Without much trouble I could isolate from a thousand colonies three sub-variants, belonging to two types; both types proved at re-inoculation to be constant, but growing older they throw off, in the habitual way, the asporgene variant, so that, in order to be preserved, they must be propagated from the spores. This can be done by pasteurising the sowing material at 55° C., by which the vegetative cells die and the spores alone survive.

In continuing this manipulation I have obtained new sub-variants. One of these produces 4- or 8-spored globular sporangia and is at first sight a new species. Cells and sporangia remind of the vegetative variant which should have regained the power of producing spores. But all the characteristics are limited between those of the normal form and the asporogene variant. So that, although this form too is hereditary-constant, I cannot see a new variety in it, but only a new variant.

It is noteworthy in this case, that the variants of the same generation, that is those which result from the same sowing, always differ by distinct breaks in the tint of the iodium reaction, and form no flowing series between main form and main variant. But I think this to be the consequence of the limited number of colonies which can be overseen at each experiment, and amount to no more than one or two thousand, and that it will be possible to fill up the gaps with sub-variants from other cultures, which perhaps grow rarer as the leaps are smaller. The question why sub-variants are so much rarer than main variants, I cannot as yet fully answer, but the

existence of sub-variants proves that the great and sudden leaps, observed in the variability everywhere in the vegetable and animal kingdoms, are no necessary of variability. Furthermore these sub-variants prove that even slight deviations may be in high degree hereditary-constant [1]).

5. *Variation in Bacillus prodigiosus.*

This well-known red pigment-bactery is cultured by me in three distinct natural varieties. One of them does not liquefy the culture-gelatin [2]), of the two others which do, one [3]) has the power of causing various carbon-hydrates to ferment under production of hydrogen, the other not [4]). All three produce, in older cultures, a variant which is completely colourless, but in all other respects possesses the properties of the normal form whence it has taken birth, so that there are non-liquefying and fermenting, and liquefying non-fermenting colourless variants. All these variants have remained hereditary-constant in my experiments and produce no atavists like to the mother form, i. e. red-coloured colonies. There is no doubt, but, if these variants were met with in nature, not accompanied by the normal form from which they arise, they would be taken for as many new species. Still it would be an error to admit them as species into the system, as a more minute investigation shows that, except in the power of forming pigment, they correspond in all other respects with the normal forms, and one single point of difference determines only a variant.

I doubt by no means that *B. prodigiosus* can also vary in other directions; this follows already from the fact that I could find three very different natural varieties, which all produce red pigment [5]). But I have not taken pains to trace other variations.

Sub-variants between the normal forms and the said colourless variants are, or at least seem rarer than the main variants. They are rose-coloured and at colony-selection almost as constant as the normal form. They also produce like the latter the constant colourless main-variant, and moreover show a propensity for atavism. In each natural variety I have found only one or two rose-coloured sub-variants.

6. *Variation in Photobacter indicum.*

This phosphorescent bactery was isolated by Prof. Fischer of Kiel, from seawater in the vicinity of the isle of Santa Cruz, one of the Antillies, on January 10, 1886. I received material of it in May 1887 and have without interruption cultured it till now. Already in 1887 I perceived, that with the growing older of the cultures, two main variants arise and even in so great a number that the normal form can be

[1]) For the more complicated phenomena of variation in some species of *Saccharomyces,* I refer to my paper »Sur la régénération des spores chez les levûres etc., Archives Néerlandaises, Sér 2, T. 2, pag. 269, 1899.

[2]) Isolated from potatoes grown hollow in the soil and given me by Prof. Ritzema Bos.

[3]) Isolated from tubercles of red clover.

[4]) Isolated from bones kept at the open air on the bone-hill of the gelatin- and glue-factory at Delft.

[5]) The red pigment of *B. prodigiosus* is a product of excretion found between the living and partly accumulated in dead bacteria. It is in my opinion the product of specific chromoplasm, which forms a small part of the protoplasm in general.

supplanted by them for the greater part, though not quite. One of these is either completely or almost completely dark, the other grows much more slowly than the normal form and is almost motionless, while the normal form is extremely motile. I will call these variants *Ph. indicum* vnt. *obscurum* and *Ph. indicum* vnt. *parvum*. Later I found some more variants which are less common. There are besides sub-variants of which I have examined those standing between the normal form and *obscurum;* they produce now and then atavists, and vary also towards *obscurum,* but can be kept constant by colony-selection.

Notwithstandig this great variability it has been possible, likewise by means of colony-selection, during the more than 13 years continued laboratory culture, to keep up the stock unchanged, which is remarkable, when thinking of the place where it was first found.

The variants and sub-variants always spring from the stock in the same way. They may be reduced to two types: variable and unvariable. All phosphorescent variants are more or less variable.

The variant *parvum* shows an extreme disposition for atavism, so that already after its first-re-inoculation on a new culture-medium, various normal forms spring from it.

The *obscurum-variants* are more constant. They are either perfectly constant, so that, as it seems, phosphorescent forms never again arise from them, or imperfectly, so that after going through a few cell-partitions, answering to as many sub-variants, the normal form returns with the full phosphorescent power. Dark variants, in this way producing luminous cultures, prove that progressive variability [1]) also occurs in the laboratory cultures.

The variant is not the product of a single heterogene cell-partition, but of the passing through some preparatory cell-partitions, answering to as many sub-variants. I was able without difficulty to distinguish two of these leaps or sub-variants, but it is possible that there are more, too slightly differing for my observation. It is also probable that by the conditions of culture, these preparatory cell-partitions, and with them the sub-variants, existing between the normal form and the main variant, will grow more or less numerous.

The *obscurum-variant* is probably produced in accordance with the scheme of Fig. 1.

For the sake of simplicity here is only figured one intermediary stadium (sub-varinat) by the dotted rod; the dark main variant is drawn black, the normal form white. This scheme answers to what may be called the development of the cell-variant by heterogene cell-partition or evolution.

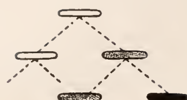
Less probable is the development of the variant by transformation or epigenesis represented in Fig. 2.

The preparatory cell-partitions at the atavism of the luminous normal form from the dark or feebly luminous sub-variants still liable to retrogression, probably answer likewise to the schema of Fig. 1.

---

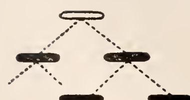
[1]) Distinction can be made between: — retrograding or analytic variability, in which a characteristic disappears entirely or partly, — replacing variability, in which a characteristic is wholly or partly supplanted by another, — and progressive or synthetic variability, in which a new characteristic is added to those already existing.

Fig. 1.



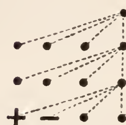
Probable course of development of the dark variant by direct heterogene cell-partition or evolution. The first partition produces from the single luminous bacillus one of the same, and another of lessened luminosity. The second partition produces from the latter again one of the same luminosity, and another quite-dark.

Fig. 2.



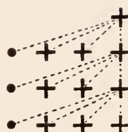
Less probable course of development of variant by indirect heterogene cell-partition or epigenesis.

Fig. 3.



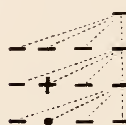
Pedigree of *Ph. indicum*, normal form.

Fig. 4.



Pedigree of *parvum*.

Fig. 5.



Pedigree of variable *obscurum*.

If the normal form is indicated by •, the *obscurum*-variant by —, and the *parvum*-variant by +, unreckoned the sub-variants, the pedigree of the normal form of *Ph. indicum* can be represented by Fig. 3, which means, that at the two first re-inoculations only the normal form is produced, and that at the third likewise *obscurum*- and *parvum*-variants have orginated, but from cells which were subjected to particular conditions. The numbers 2 and 3 for the generations are chosen arbitrarily, for the number of generations, after which the variation occurs, can be regulated at will, for by early re-inoculating the young cultures on fish-broth-agar (not on fish-broth-gelatin) the variation can be kept back for a long time [1]).

For the variant *parvum* the pedigree becomes somewhat different from that of the normal form, there being much atavism (Fig. 4).

The pedigree of *obscurum* can, as to the constant form, be represented by a single mark.

The variable, *obscurum*, again produces atavists, but less than *parvum*, and besides *parvum*-variants (Fig. 5).

In these three last schemes are, as said, the sub-variants left out.

I have not succeeded from *Ph. indicum* to obtain a perfectly constant luminous form, that is, one which produces no variants, though I have tried for years to do this by selection. It is evident that the conditions of culture inavoidably give cause to the rise of variants. That for the rest the faculty of varying in a very determined way, is deeply rooted in the nature of the cell, is proved by the following observations.

[1]) To these relations I hope to refer at another occasion.

A few years ago Mr. Fischer at Kiel again sent me some material of *Ph. indicum,* which had thus during many years been cultivated in his laboratory. There was a considerable difference, compared to my stock, but the normal form and the two variants *obscurum* and *parvum,* I could still obtain from it as constant forms by means of colony-selection.

At the examination of numerous samples of seawater in all the seasons, taken near Scheveningen, Bergen op Zoom and den Helder, partly far from the coast [1]), I have never found *Ph. indicum* itself, but, even three times, forms which, with a broad conception of the species, might be considered as varieties of it, and else as very closely allied species. I call them *Ph. splendidum* and *Ph. splendor maris.* Short after the isolation already they produced variants, one of which is quite dark and multiplies in such a number that in cultures which are negligently re-inoculated the normal form, and with it the photogenic power, wholly disappear.

Thus, a culture at 22° C. of *splendor maris* going out from a single phosphorescent colony, after being in 12 days six times re-inoculated on fish-broth-gelatin, produced 1800 dark variants on 22 colonies of the normal form. The culture re-inoculated six times in the same space of time on fish-agar did not yet contain any variants, whilst at the 12th re-inoculation on agar their number was also very great. The first not further re-inoculated cultures on gelatin, which accordingly had only had little opportunity to grow, after 12 days did not contain variants, in accordance with the rule that at cessation of growth no variability is manifested.

The *parvum*-variant also is in *Ph. splendidum* and *Ph. splendor maris* as distinctly recognisable as in *Ph. indicum* itself, and here too, frequently produces the primitive forms as atavists.

Basing on these experiences I think it probable, that the cause which calls forth the variants is not exclusively acitve in our artificial cultures, but can also be active in the sea itself, so that in this case there is a chance that dark forms, isolated from the sea will at first be taken for particular species, but after more minute observation, will prove to be variants of known phosphorescent bacteria.

By observing certain general conditions the production of dark variants can, as said, be greatly slackened, but not wholly prevented. Among these are: strong nutrition and vigorous growth a little below the optimum temperature, free access of oxygen, such as can be attained in cultures on agar-agar, and total exclusion of the influence exerted by the secretion-products of the bacteria themselves, which is attainable by re-inoculating the young cultures very often on a new medium.

7. *Conclusion.*

I will begin with pointing to the fact that hereditary variability is a function of growth, in particular of slackened growth, but that at cessation of growth no change takes place. And furthermore that variability attacks only one independent charac-

[1]) Many of these samples I owe to the kindmess of Dr. Hoek. Various species of luminous bacteria have been found in them to the amount of 0.1 to 5, even 7 pCt., of all present bacteria. Especially *Ph. luminosum,* and a species difficult to distinguish from it, but still quite different, *Ph. hollandiae,* occur very often. *Ph. degenerans* also is frequent.

teristic at a time. In the sub-variant one characteristic of the normal form is partly, in the main-variant it is wholly changed. In new varieties and species more characteristics are varied.

Furthermore resuming the above given statements I come to the following conclusions. The here discussed forms of hereditary variability belong to three types: At *degeneration* all individuals, by a slow process of variability, lose their vegetative power, so that the species may cease to exist. At *transformation,* which seems to appear more seldom, all individuals lose a specific characteristic and acquire either or not another instead. At the common hereditary variability or *variation,* the normal form, probably by heterogene, cell-partition, throws off some individuals, the variants, mostly differing from it by a strongly salient characteristic. The normal form itself propagates beside it quite unchanged. The variants are constant in a way corresponding with independent species, sometimes this constancy is perfect, in other cases atavists are produced, like to the normal form. Subvariants i. e. intermediate forms between normal form and variant, are less *found* than the variants themselves, but they are perhaps never wanting, and are in the same way constant as the normal forms. Whether the sub-variants are also originally *formed* in smaller number than the main variants is uncertain; what is seen is that they rapidly disappear from the cultures and are supplanted by the normal form and main variants if they are not fixed by colony-selection. Besides, each well-defined degree of variation, however slight, seems to be fixable.

The rare occurrence of the sub-variants throws some light, *First,* (by the comparison of the individual microbes with the individuals of the higher organisms) on the marked distinctness by which in higher plants and animals most varieties and species are separated, — for they originate by repeated variation processes, relative to different characteristics — and the chance that the common and distinctly discernable variants will partake therein and not the rare sub-variants, more difficult to distinguish, is accordingly greatest [1]).

Second, (by the comparison of the individual microbes with the tissue-cells of the higher organisms) on the no less marked confines between the tissues and the organs of one and the same individual, — for these are constituted of as many cell-variants of the embryonal cells, cell-variants, which will supplant the cell-sub-variants.

[1]) I perfectly agree with Professor de Vries, that the origin of species should often be sought in the almost suddenly produced variants, or mutants, as he calls them. This is also the conclusion to which Galton has come regarding the races, and to which he referred repeatedly since 1892, the last time, so far as I know, in Nature T. 58, pag. 247, 1898 in these words: »I have frequently insisted that these sports or »aberrances« (if I may coin the word) are notable factors in the evolution of races. Certainly the successive improvements of breeds of domestic animals generally, as in those of horses in particular, usually make fresh starts from decided sports or aberrances aud are by no means always developed slowly through the accumulation of minute and favourable variations during a long succession of generations«. Along quite distinct ways Galton, de Vries and myself have thus arrived at the same conclusion regarding the probable origin of many races and species. But the great difficulty which lies in the explanation of the adaptions, has not been removed, neither by Galton's »aberrants«, de Vries »mutants«, nor my »variants«.

That many so-called new species will prove only variants of other species and no »good species«, is not improbable. Especially in the microbes, where the want of crossing must strongly favour the prolonged continuing of the once formed variants, it is to be foreseen that in nature will often be found variants, which will long maintain themselves at their habitat. If they are isolated, the discoverer will at first be almost sure to see new species in them, and only after an accurate investigation recognise them as variants of another species.

The sub-variants of the microbes prove, that the characteristics which in the main variants are quite wanting disappear by little leaps from the normal forms. In other cases, however, the main variants seem to appear suddenly, whence it would follow, that a characteristic can also vanish at a single leap at the cell-partition; but here the sub-variants may have escaped from observation.

The variants of the microbes, regarded as cell-variants, prove that out of a cell daughter-cells may spring unlike to the mother-cell. Though the way in which this is effected is still insufficiently known, it proves the existence of heterogene cell-formation, whether by direct heterogene cell-partition (fig. 1), or, by the less probable transformation (fig. 2).

In order to show how decidedly heterogene cell-formation is still considered as impossible, so that it is not superfluous to afford a new evidence for its existence, I refer to the well-known book of O. Hertwig »Die Zelle und die Gewebe«, p. 64, Bd. 2, Ed. 1898, where we read as follows: »Die Theorie der heterogenen Zeugung, wo sie aufgestellt wurde, ist als grober Irrthum bald beseitigt worden. So gilt als ein allgemeines Grundgesetz in der Biologie der Ausspruch »Gleiches erzeugt nur Gleiches« oder besser »Art erzeugt stets seine Art.« Bei allen einzelligen Lebewesen ist erbgleiche Theilung ihres Zellenorganismus die einzige, die vorkommt und vorkommen kann. Auf ihr beruht die Constanz der Art. Wenn es möglich wäre, dass bei irgend einem einzelligen Organismus die Erbmasse (Idioplasma) durch Theilung in zwei ungleiche Componenten zerlegt und auf die Tochterzellen ungleich übertragen werden könnte, dann hätten wir den Fall einer heterogenen Zeugung, den Fall der Entstehung zweier neuer Arten aus einer Art. Wie indessen alle Beobachtungen lehren, werden auch bei den Einzelligen die Arteigenschaften so streng und bis ins Kleinste überliefert, dass einzellige Pilze, Algen, Infusorien auch noch im millionsten Gliede, ihren weit entfernten Vorfahren genau gleichen. Der Theilungsprocess als solcher erscheint daher auch bei den einzelligen Organismen nie und nirgends als Mittel um neue Arten ins Leben zu rufen.«

The preceding pages prove that this view is erroneous, so that the far reaching conclusions, drawn from it in relation to ontogeny vanish at the same time.

So far there is thus no reason in contradiction with observation, which forbids admitting, that the ontogeny of the higher organisms consists in a regular course of variation processes, and that full-grown plants and animals are built up of as many cell-variants of the embryonal cells, as they contain different tissus composed of identic cells.

On the development of Buds and Bud-variations in Cytisus adami.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. III, 1900, blz. 365—371. — Verscheen onder den titel »Over het ontstaan van knoppen en knopvariaties bij Cytisus adami« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel IX, 1900, blz. 336—342, en onder den titel »Ueber die Entstehung von Knospen und Knospenvarianten bei Cytisus adami« in Botanische Zeitung, Leipzig, 59. Jahrgang, 2. Abteilung, 1901, S. 113—118.

Cytisus adami is a hybrid between the common laburnum, *Cytisus laburnum,* and a little shrub from Styria, *Cytisus purpureus,* with purple flowers. Now and then are found on *Cytisus adami* buds of both species as bud-variants[1]). The experience that these buds appear in particular on older parts, and have, probably without exception, passed one or more years in dormant condition before budding and changing into the primitive forms[2]), induced me to cut down all the branches and the main stem of four specimens of *C. adami* in order in this way to excite the development of the very old buds which were, since years, in dormant condition on the old trunk. My expectation, that by these means I should obtain a great number of bud-variants, proved right: in few years I saw, together with earlier observations, appear more than a hundred buds of *laburnum* and about twenty of *purpureus.* I was thereby enabled to establish a few paticularities about buds and bud-variations which follow here:

1. The ordinary axillary buds of *Cytisus adami* spring not from single cells but from cell-groups. They grow on by means of a pluricellular meristem, and not by means of one terminal cell. The latter fact was long known already and is here anew confirmed.

2. The bud-variants, also, originate from cell-groups and not from single cells, so that the cause which is active here in producing variability, must extend over many cells at a time.

That this cause is in some or other way related to unfavorable conditions of nutrition cannot be doubted.

Of course the possibility is not excluded that for *C. adami* buds and bud-

---

[1]) The word »variant« is here used in a sense somewhat different from that in the preceding paper on the variants of microbes, »component« might perhaps be more precise in this case. But I keep to the usage, as the meaning is clear.

[2]) This does not hold good for the flowers, which have no dormant period but constantly develop in the 2d year, and of which the different parts are still more subject to return to the components than the vegetative buds. But the flower may, even unreckoned the process of fertilisation, be called the organ of variability.

variants can spring from single cells. I think this even probable as regards some of the many buds which develop from the »bud-crown«[1]). Herewith is meant the sheath of vigorously vegetating cambium-cells which is found in the callus and the bark, just in the prolongation of the procambium- or cambium-cells of truncated or thrown off buds or branches, which sheath is an active centrum for the originating of new buds. For the rest, it is not the springing forth of a bud or new individual from a single cell which is remarkable, but the fact that this can take place from an already constitudet cell-group. That this really occurs, and also, that a meristem constituted of many cells may be subject to the process of variation, is proved by the following observations.

At about ninety *laburnum*-buds which had developed as variants, nothing particular was to be seen, but at eight or nine were found at the base a greater or smaller number of bud-scales which could with certainty be recognised as bud-scales of *adami* (*ad* Fig. 1 A).

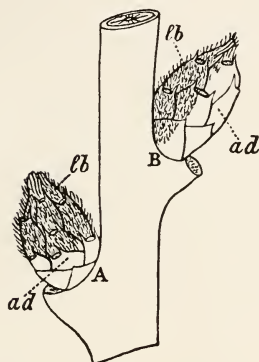


Fig 1.
Two *laburnum* bud-variants on a branch of *Cytisus adami*; the lower bud *A* bears at its base *adami* bud-scales, but is in the higher portion pure *laburnum*; the upper bud *B* is precisely for one half *adami*, for the other *laburnum*.

This observation is easy and convincing, as all parts of *laburnum*, hence the bud-scales too, are covered with silverwhite hairs, especially at the under- or back-side, while the full-grown portions of *adami* are always devoid of hairs. In all the cases, which I examined more minutely, the line of demarcation between the *adami*- and *laburnum*-portion ran in an oblique direction, so that the whole meristem belonged evidently to *laburnum*. This was constantly confirmed by the experience at the budding, as always pure *laburnum*-shoots grew from these buds.

In 1898 an extraordinarily great number of *laburnum*-variants were formed on my *adami*-trees. In consequence of the early pruning all the buds were situated low enough to be easily examined with the magnifying-glass. Two of them presented themselves as in Fig. 1 B. The line of demarcation went precisely over the middle of the bud scales and not obliquely as in the eight cases above. The supposition that the said demarcation would also continue precisely over the middle of the meristem, proved right at the budding, for both the branches which sprung from these buds in 1899, were exactly for one half, lengthwise, *adami*, for the other half *laburnum*.

One of these »mixed branches« has attained a length of about 1 Metre, and produced more than 30 leaves with axillary lateral buds, of which about 15 belonged to *laburnum*, the other 15 to *adami*. At its extremity was in the antumn of 1899 an open »summer-bud«, still for one half *adami*, for the other half *laburnum*; this summer-bud was not closed with bud-scales, and died in the winter of 1899—1900.

[1]) Translated from the German »Knospenkrone«.

The second branch has become about $^1/_2$ M. long, and bore more than 12 leaves with axillary buds, again belonging for one half to *laburnum*, for the other to *adami*. In the autumn of 1899 a closed »winter-bud« with bud-scales was formed at the extremity. Though the line of demarcation seemed also to go over the middle of this terminal bud, a *laburnum*-branch developed from it in the summer of 1900, which only at the base bore some *adami*-leaves, so that the separation within the bud must have run obliquely and divided the meristem into a larger *laburnum*- and a smaller *adami*-portion.

This description proves that the two halves of the »mixed branches« have each grown from an independent half of the meristem, which half cannot consist of less than one cell, so that the continued growing of the branches with one terminal cell is out of question, accordingly it is certain that the branches of *Cytisus adami* grow with at least 2, and probably many more meristem cells.

The two separating lines between *laburnum* and *adami* which are seen over the full length of the »mixed branches«, easily discernible on the bark as the confines between a portion set with hairs and another without, ran in 1899 for the greater part of course between the leaves, but in some places also through the leaves themselves. Some of these »mixed leaves« were situated exactly for one half on the *laburnum*- for the other on the *adami*-portion of the branch. In this case the trifoliate leaf was as exactly for one half an *adami*- and for the other a *laburnum*-leaf, and over the whole length of the petiole and the midrib of the terminal leaflet the line of demarcation was distinctly discernible. This would, if necessary, be sufficient to prove that also each leaf takes birth from at least two, and probably more meristem cells. But the pluricellular origin of the leaves of the higher plants has, so far as I know, never been called in question, though this has been the case concerning the origin of the lateral buds.

So, it was of importance to establish whether the axillary buds of these »mixed leaves«, exactly placed on the confine, would likewise produce »mixed branches«, by which the question would be answered if one bud might spring forth from two or more cells at a time. The answer was not dubious: all the buds, placed in the axils of the leaves, which were for one half *laburnum*, for the other *adami*, produced, in the summer of 1900, as well *laburnum*- as *adami*-leaves, and in this case, too, some leaves again were mixed, namely partly *adami*- partly *laburnum*-leaves.

In most cases the line of demarcation went very obliquely through the »mixed buds« of this second generation, so that the whole meristem early in the year consisted of only *adami* or only *laburnum*. In one of these buds however the boundary line went precisely through the middle, but this bud contained an inflorescence of which the summit had died off in the winter of 1899 — 1900. At the base were however pure *laburnum*- and pure *adami*-flowers, and one flower was precisely for one half *laburnum*, for the other *adami*, so that also flowers evidently spring not from one cell, but from a cell-group.

The preceding description proves that in the springing forth of the *laburnum*-variant from *Cytisus adami*, as well a whole meristem may be concerned as half of it, and that the cause which gives rise to the appearance of a bud-variant is active when the meristem is completely formed, and not in the far-back moment when the cell-group, which later manifests itself as a meristem, was still a single cell. For if

this were the case it could not be possible that a portion of the bud, which produces the variant, continued to belong to *C. adami* itself.

Hence it follows that the bud-variant is not produced by variation of a single cell but by that of a cell-group.



Fig. 2.

One year's *purpureus, ps,* sprung as a bud-variant, from a dormant *adami*-bud, at the extremity of a »short-shoot« *ad.* On the left a »long-shoot« of *adami,* at the extremity of a »short-shoot«.

To show that also the *purpureus*-variant is produced by the variation of an already constituted *adami*-meristem, and not of a single cell, far-back in the evolution of that meristem, I refer to Fig. 2.

Here we see a one year's *purpureus*-shrub (*ps*) placed at the extremity of a »short-shoot« of *Cytisus adami*[1]). Commonly the *purpureus*-variants, quite like those of *laburnum*, spring from comcom buds, whence the exact moment of their birth is not clear. But the peculiarity of the case figured here is that the »short-shoot«, terminating in *purpureus*, had already grown for a number of years as *adami*, and that consequently it is not possible to doubt, that *purpureus* has come forth from the whole *adami*-meristem. As this meristem is pluricellular, the cause, which led to produce the *purpureus*-variant, must thus also have affected a cell-group and not have been confined to a single cell.

---

[1]) A »short-shoot« consists of a closely crowded succession of nodes, between which the internodes are not developed; they grow very slowly and point to unfavorable conditions of nutrition.

In a few cases the *purpureus*-bud was not found alone, but also some *adami*-buds of the nearest surrounding were changed into *purpureus*. So, this summer, in my garden, of six quite independent, dormant, three years' buds at the summit of a »long-shoot« of *Cytisus adami*, separated from each other by relatively short internodes of the longshoot, no less than four are changed into *purpureus*, and besides, the two unchanged *adami*-buds are placed between the higher and lower situated *purpureus* branchlets. Accordingly the influence which caused the variation must have been active simultaneously in four meristems, the distances between which, at the time of the variation, must certainly have amounted to some tenth parts of millimeters.

Herewith I think to have made good the two statements expressed at the beginning of this paper, and I only wish to add that already before, but at quite another occasion (*Cécidiogénèse du Cynips calicis.* Archives Neêrlandaises, Sér 2, T. 2, 1897, pag. 436), I came to the opinion that variability, though habitually going out from a single cell, is not necessarily always bound to it, but sometimes has a cell-group as starting point, so that there can be question of uni- and pluricellular variability.

The relatively great number of bud-variants of *adami*, which I have examined, consisted, as usually, only of pure *laburnum*- and pure *purpureus*-branches. Hybrids, in which both factors occur, but one preponderant as compared to its part in *adami*, seem never to be produced. Still I believe that in the cell-layers of the bud-meristem, which form the separation between *adami* and one of the variants, there must occur transitory cells, which, could they be independently developed and cultivated into new individuals, would produce such derivated hybrids. Perhaps the »supplanting« of these transitory cells by the completely varied cells, may be compared to the rarity (discussed in the preceding paper on the variants of microbes) of the subvariants as compared to the normal form and the main variants, by which it seems possible to explain, on the one hand the existence of distinctly marked bounds between the species, on the other hand, the not less marked bounds between the different organs and tissues of the higher organisms.

Noch ein Wort über die Sulfatreduktion in den Gewässern.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, II. Abteilung, VI. Band, 1900, S. 844.

Saltet's Aufsatz in diesem Blatte[1]), woraus ich ersah, daß er über die verwandtschaftlichen Beziehungen seiner Bakterie in Zweifel gekommen war, veranlaßte mich, eine Kultur derselben zu untersuchen. Es stellte sich aber heraus, daß es sich, wie ich das früher auf Grund seiner eigenen Ansicht ausgesprochen hatte, thatsächlich um eine Coli-Form handelt, und zwar um Aërobacter coli var. infusionum, sehr allgemein in Pflanzeninfusen, in Mehl, im Boden und in Grabenwasser[2]). Einige Versuche mit dieser Bakterie, Sulfatreduktion zu bewirken, gaben wie früher, ein vollständig negatives Resultat, so daß Saltet's Behauptungen unrichtig sind. Einstweilen bleibt mein Spirillum desulfuricans also die einzige bekannte Art, wodurch Sulfatreduktion stattfindet.

---

[1]) Centralbl. f. Bakteriol. etc. II. Abt. Bd. VI. 1900. p. 699.

[2]) Für die Beschreibung verweise ich auf Centralbl. f. Bakteriol. etc. II. Abt. Bd. VI. 1900. p. 205.

Sur les ferments lactiques de l'industrie.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome VII, 1901, p. 212—243. — Verscheen onder den titel »Ueber Milchsäure-Bakterien der Industrie« in Zeitschrift für Spiritusindustrie, Berlin, 25. Jahrgang, 1902, S. 531, 541, 543—544, 550—551, 553.

Il existe dans l'industrie un procédé appelé le procédé du levain lactique qui peut être considéré comme le point de départ et le fondement de l'industrie de levûre de boulanger. Le but de ce procédé est la production d'une fermentation lactique aussi pure que possible dans du moût ou dans des macérations brutes de farine. Dans le dernier cas on emploie un mélange de malt et de seigle, broyé ou moulu et traité d'une manière ingénieuse, pour y développer seulement un ferment lactique spécial. On se rend aisément compte des difficultés de ce procédé quand on considère que le travail se fait dans des milieux non stérilisés, ce qui est nécessaire pour la conservation de l'amylase et des corps albumineux non coagulés, et que presque toutes les espèces microbiennes du sol se rencontrent sur les particules de farine. Il s'agit donc ici d'un »expériment« gigantesque d'accumulation d'une seule espèce de microbe, d'un expériment qui se répète continuellement dans des centaines d'usines, réparties dans tous les pays et d'un intérêt tout particulier pour les microbiologistes. Dans les pages suivantes les principaux phénomènes vitaux du ferment actif de ce procédé seront considérés du plus près. Pour la clarté il sera nécessaire d'aborder plusieurs questions regardant la fermentation lactique en général et de donner un court aperçu de la question des espèces chez les microbes provocateurs de cette fermentation. C'est avec le dernier point que je commencerai.

1. *Les Lactococcus et les Lactobacillus.*

Un assez grand nombre d'espèces de bactéries produisent en présence de sucre dans leur milieu de culture, plus ou moins d'acide lactique. Relativement peu nombreux est pourtant les ferments lactiques actifs, c'est-à-dire les formes qui produisent tant d'acide qu'elles en deviennent utiles ou nuisibles à l'industrie, notamment à quelques industries agricoles [1]). Les pages suivantes se rapportent exclusivement au dit groupe; toutes les espèces qui, d'après nos connaissances actuelles ne semblent produire l'acide lactique qu'en petite quantité, restent ici hors

[1]) A comparer A. Mayer, Studien über die Milchsäuregärung, Zeitschrift für Spiritusindustrie, Bd. 14, pag. 183, 24. Juni 1891.

de considération. Donc, les espèces mentionnées par M. Kayser[1], M. G. Tate[2], M. Péré[3], M. Aderhold[4]) et d'autres ne seront pas discutées ici.

Les ferments actifs appartiennent à deux genres naturels, *Lactobacillus* et *Lactococcus,* qui se distinguent nettement aussi bien par la forme que par leurs qualités physiologiques et qui, d'après ma conception, sont certainement des genres phylogénétiques et non point des »genres physiologiques«, comme par exemple *Photobacter,* ou simplement morphologiques comme les »genres« *Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus,* etc. qui tous contiennent des formes bien éloignées dans le système naturel.

Le genre *Lactococcus* comprend les microcoques, les diplocoques et les streptocoques qui provoquent, à des températures au-dessous de 30° C., la fermentation lactique du lait; ce sont eux qui produisent ordinairement l'acide lactique dextrogyre. Les formes les plus connues sont le ferment lactique commun de la crême aigrie, *Lactococcus lactis*[5]), une espèce très polymorphe, qui comprend nombre de variétés bien difficiles à distinguer et qui se laisse isoler le plus facilement du lait de beurre. A présent, des cultures pures de cette espèce, tant à l'état sec que humide, se rencontrent dans le commerce sous le nom hollandais de »zuurwekkers« (producteurs d'acide). Un deuxième espèce importante du même genre est le *Lactococcus hollandiae* Weigmann, le ferment mucipare du petit lait filant. Elle produit seulement très peu d'acide, et on s'en sert en Hollande pour combattre les maladies du fromage et en Norvège on le cultive en du lait pour en préparer un aliment populaire.

Au genre *Lactobacillus* doivent être rapportés les ferments lactiques actifs de forme bacillaire qui produisent l'acide actif lévogyre et qui se rapprochent du genre *Aérobacter* dont j'ai donné la diagnose en 1900[6]). Pourtant *Lactobacillus* se distingue de ce genre en ce que la production d'hydrogène, caractère important pour le diagnostic d'*Aérobacter,* y manque absolument, ainsi que dans tous les autres ferments lactiques actifs.

C'est surtout ce groupe qui joue un grand rôle dans la nature comme dans l'économie. Ce sont les *Lactobacillus* qui provoquent, à des températures au-dessus de 30° C., une acidification très intensive du lait, recherchée dans plusieurs boissons qui en sont dérivées chez les peuples primitifs et nomades. Telles sont le Kéfyr du Caucase, le Koumys de l'Asie centrale et le Matzoon de l'Arménie. Quoique

---

[1]) Kayser, Etudes sur les ferments lactiques. Annales de l'Institut Pasteur, T. 8, p. 737, 1894. Il est très difficile de reconnaître les espèces de cette étude, et je doute même si parmi les 15 espèces décrites il y ait un seul »ferment lactique actif« dans le sens que je donne à ce terme.

[2]) The Fermentation of Dextrose, Rhamnose and Mannitol, by a Laevolactic ferment. Journal of the Chemical Society. Vol. 63, pag. 1263, 1893.

[3]) Formation des acides lactiques isomères. Annales de l'Inst. Pasteur, T. 7, page 737, 1893.

[4]) Untersuchungen über das Einsäuern von Früchten und Gemüsen. Landwirthschaftl. Jahrbücher 1899, pag. 69.

[5]) *Bacterium lactis acidi* de M. G. Leichmann, Ueber die freiwillige Säuerung der Milch. Centralbl. f. Bacteriologie, 2te Abth. Bd. 2, pag. 777, 1896.

[6]) Aufstellung der Gattung *Aérobacter,* Centralbl. für Bacteriologie 2te Abth. Bd. 6, pag. 198, 1900.

dans toutes ces préparations l'acidification soit inaugurée par les *Lactococcus,* la majeure quantité de l'acide lactique est produite par des *Lactobacillus.* L'acide lactique qui se trouve dans ces boissons est donc généralement, comme on pouvait prévoir, un mélange des acides dextro- et lévogyres, le dernier en prépondérance. Plus rarement on n'y rencontre que le produit des *Lactobacillus,* c. a. d. l'acide lactique lévogyre seul. Ce sont en outre des *Lactobacillus* qui produisent l'acide dans le fourrage vert ensilé pour le bétail, — qui conduisent la maturation du fromage dans la bonne direction, — qui provoquent l'acidification du chouxblanc salé de nos caves, — qui remplissent chez les petits enfants, pendant la période de la lactation, tout le tractus intestinal et dont se composent leurs faeces dites de couleur vitelline [1]). Ce sont eux aussi qui ont servi jadis à M. Bensch et à d'autres expérimenteurs pour la production de l'acide lactique [2]). Mais la signification la plus importante des *Lactobacillus* est l'emploi qu'on en fait dans l'industrie des levûres. Il s'agit ici des microbes du levain lactique dont j'ai déjà parlé dans le mot introductoire et qui seront traités amplement après. Mais avant d'en aborder la physiologie je dois encore indiquer une signification tout autre que peuvent avoir les *Lactobacillus,* dont certaines formes causent des corruptions bien redoutées dans les matières contenant des carbohydrates.

C'est ainsi que la plus fâcheuse maladie de la bière, la maladi de »la bière tournée«, est causée par plusieur espèces de *Lactobacillus* [3]). Il en est de même de la levûre de boulanger, dont les plus redoutables ennemis, — causes première de sa corruption, — se trouvent parmi les formes de ce genre. Ce fait est assez surprenant si l'on considère que c'est le levain lactique, complètement rempli de *Lactobacillus,* qui forme le fondement nécessaire de la culture industrielle de la levûre. Mais tous ces ferments de »corruption acide« se distinguent du ferment du levain lactique en ce qu'ils peuvent se développer à des températures au-dessous même de 25° C., tandisque le dernier a sa température minimum de croissance au-dessus de 25° C.

La question des espèces dans le genre *Lactobacillus* présente nombre de difficultes; la littérature en donne à peine le premier début [4]). Surtout quand on a étudié longuement ce groupe on se trouve dans un véritable chaos de formes peu différenciées mais toutes plus ou moins héréditairement constantes. Pourtant, j'ai la conviction que cette situation scientifique n'est qu'une période de transition, et que la grande sensibilité des qualités héréditaires de ces ferments envers les influences extérieures bien définies, qui seront démontrées plus amplement dans les §§ 7 et 8,

---

[1]) Zu vergl. A. Rondella, Ueber die acidophilen Bacillen im Säuglingsstuhle Centralbl. f. Bacteriologie Abt. I, Bd. 29, pag. 717, 1901.

[2]) A. Bensch, Ueber die Darstellung der Milchsäure und Buttersäure. Ann. der Chemie und Pharmacie Bd. 61, pag. 174, 1847.

[3]) Il y a pourtant des cas, par exemple chez certaines bières belges comme le lambic et le faro, ainsi que dans le Weiszbier du nord de l'Allemagne, où l'acidification par les *Lactobacillus* est indispensable pour le commerce et est produite artificiellement. Le »Guinness' Stout« de Dublin nous montre un fait encore plus étonnant: à Dublin cette bière ne peut être vendue que fraîche, tandisqu'à Londres elle ne se vend que tout à fait acidifiée et corrompue par des *Lactobacillus.*

[4]) Pendant la correction de cette étude pour la presse vient de paraître: W. Henneberg. Zur Kenntniss der Milchsäurebacterien der Brennereimaische, der Milch und des Bieres, Wochenschrift für Brauerei, 1901, N°. 30.

donnera des éclaircissements multiples sur l'origine des formes, et peut-être sur les causes intimes de la variabilité en général.

La pratique de la science nous oblige partout à classifier; dans ce cas aussi je suis dans la nécessité de coordonner les formes dans un certain nombre de types dont l'étendue correspond environ à la conception ordinaire d'espèce. Voici quelques-unes des plus importantes.

Passant sous silence pour le moment les *L. fermentum* et *L. delbrücki*, producteurs du levain lactique, nous rencontrons en premier lieu le *Lactobacillus caucasicus*, dont les zooglées sont bien connues sous le nom de grains de Kéfyr [1]). D'abord je croyais que le Kéfyr devrait nécessairement contenir aussi une certaine espèce de levûre, le *Saccharomyces Kéfyr*, mais des recherches ultérieures ont démontré que le *Lactobacillus caucasicus* seul peut produire lentement, à des températures basses, sur du petit lait gélatinisé de petits »grains de Kefyr« solides et cartilagineux, ressemblant parfaitement, sauf leur petitesse, aux grains du commerce, et qui sont exempts de toute infection étrangère, d'où il s'ensuit que les autres symbiontes qu'on trouve plus ou moins généralement dans les grains ne sont que des-habitantes accidentaux [2]). Mais la variabilité du *L. caucasicus* est excessive. Les petits grains des cultures se décomposent lors du transport en de petites colonies molles ramifiées ou non ramifiées, de couleur blanche ou jaune et parfois visqueuses, mais toutes très différentes du souche original; toutefois, ces dernières qualités, et spécialement la viscosité, sont très inconstantes.

Le *L. caucasicus* se trouve toujours en petit nombre dans le levain lactique de la fabrique néerlandaise de levûre et d'alcool à Delft et en peut être porté en culture pure par des transports réitérés dans du moût liquide à 37^0 C. ou au-dessous de 37^0 C. Déjà après le quatrième transport j'ai trouve, en certains cas, le *L. caucasicus*, qui avait transplanté les vraies bactéries du levain, c. à. d. les *L. delbrücki* et *L. fermentum*, tout seul. Cultivé de cette manière le *L. caucasicus* produit, sur du moût gélatinisé, à 23^0 C., de petites colonies blanches, formées de bacilles droits, assez courts. La culture à 23^0 C. sur du moût gélatinisé est aussi la meilleure méthode pour obtenir l'espèce en culture pure directe du levain lactique, les ferments propres du levain, les *L. delbrücki* et *L. fermentum*, ne pouvant se développer à cette température. Hors les *L. fermentum* et *L. delbrücki* qui ne fermentent pas le lactose, le *L. caucasicus* qui produit l'acide lactique aussi bien du maltose que du lactose, est la seule espèce du genre avec laquelle on puisse préparer un levain lactique à acidité suffisante. Toutefois l'emploi de ce bacillus me semble dangereux pour l'industrie de levûre car il peut vivre et se multiplier dans la fermentation alcoolique principale au-dessous de 25^0 C., ainsi que dans la levûre de boulanger elle-même dont il est un agent actif de corruption et où il se trouve assez généralement répandu. Pour l'isoler de la levûre de boulanger on peut cultiver celle-ci dans du moût à 40^0 C. Cette température est trop haute pour la levûre elle-même ; il n'y a que les ferments lactiques (et une levûre sauvage, le *Saccharomyces fragrans*) qui puissent se développer dans ces circonstances et dans

---

[1]) A comparer mon article: Sur le Kéfyr, Ces Archives T. 23, pag. 428, 1891.

[2]) M. Freudenreich a abouti à la même conclusion (Centralb. f. Bactériol. 2e Abt. Bd. 3, pag. 47, 1897).

ce cas le *L. caucasicus* peut être isolé sur des plaques de moût gélatinisé. Encore peut-on éloigner de ces cultures le *S. fragrans* par la »lactisation« dont il sera question dans § 3 et qui laisse seul les *Lactobacillus* vivants.

Dans les dernières années il se trouve dans le commerce une culture d'un *Lactobacillus* recommandé pour en préparer le levain dans les distilleries. C'est le *L. acidificans longissimus* de M. Lafar [1]). Dans un échantillon qu'on me présenta, je trouvai une forme du *L. caucasicus*. Pour compléter les observations sur la distribution de cette espèce je dois faire mention de l'apparition régulière d'une de ses variétés dans le fromage hollandais, où elle cause, en symbiose avec le *Lactococcus lactis*, l'acidité importante de ce produit, laquelle est de 15 à 20 cM^3 d'acide normal sur 100 grs. de fromage.

Une espèce très voisine du *L. caucasicus*, connue depuis plusieurs années dans mon laboratoire sous le nom de *L. longus*, est obtenue par l'expériment suivant. Quand on laisse le lait frais et bien aéré pendant deux ou plusieurs jours à des températures de 25° à 33° C., il s'acidifie par l'acide lactique dextrogyre produit par le *Lactococcus lactis* jusqu'à 8 ou 10 cM^3 mesuré en acide normal par 100 cM^3 du lait. Si l'on place ce lait aigri dans l'étuve à 37°, ou même à 40° C., il se forme une nouvelle quantité d'acide lactique, maintenant lévogyre, par un *Lactobacillus*, le *L. longus*, qui se distingue facilement du *L. caucasicus* par l'absence complète de la faculté de produire l'acide lactique du maltose.

D'autres espèces sont obtenues de la manière suivante. Si l'on expose la levûre de boulanger à la corruption spontanée en la plaçant dans l'air humide à 30° C., et l'ensemence après trois ou quatre jours sur du moût gélatinise, il se développe, outre le *L. caucasicus*, deux autres espèces assez caractéristiques, nommées dans mon laboratoire *L. fragilis* et *L. conglomeratus*. La première est aisément reconnue par la grande différence de largeur dans les fragiles bacilles de la même colonie, tandisque les colonies de l'autre sont composées de fils et de bacilles si merveilleusement contournés et tortillés qu'on peut à peine se convaincre que ce sont réellement des bactéries [2]). On peut retrouver ces mêmes et encore d'autres espèces dans la vinasse spontanément acidifiée.

Ponr le reste il serait inutile de multiplier davantage ces cxemples de formes peu connues sans des descriptions très minutieuses.

2. *Caractères généraux des ferments lactiques actifs.*

Avant de terminer l'aperçu cursoire des plus importants ferments lactiques actifs, il me faut signaler quelques caractères généraux par lesquels toutes les espèces se distinguent des autres microbes et qui rendent facile la recognition de leurs colonies même au milieu d'innombrables colonies d'autres espèces.

En premier lieu on les reconnaît, sauf à la haute acidité produite dans tous les milieux nourriciers sucrés et à l'absence complète de mobilité, à la petitesse de leurs

---

[1]) Technische Mycologie Bd. I, p. 223, Jena 1897.

[2]) A ce que je crois ce sont des variants du *L. caucasicus*, le mot »variant« pris dans le sens que j'y ai attaché dans ces Archives 2me Série. T. 6, pag. 5, 1901. Pourtant, comme je n'ai pas vu directement la transition, je dois, pour le moment, les considérer comme des espèces particulières.

colonies sur un substratum solide, même dans des conditions les plus avantageuses de nutrition. Pourtant, comme il y a nombre de microbes qui restent chétifs sur des substrata gelatinisés cet indice seul ne suffit pas à la recognition. Mais les ferments lactiques actifs deviennent tout à coup visibles, parmi les mélanges les plus compliqués, par l'application du peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse de 3% ou plus. Ce corps possède la qualité remarquable de rester inaltéré au contact de tous les ferments lactiques actifs tandisqu'il se transforme presque subitement en eau et en oxygène libre par le contact avec tous les autres corps vivants ou bien avec les parties de ces corps, soit vivants, soit nécrobiotiques [1]), n'importe la classe du système naturel à laquelle ils appartiennent. La manipulation de cette réaction est tout à fait simple: la culture se fait sur une plaque solide et quand toutes les colonies sont devenues bien visibles, on dépose une goutte de peroxyde d'hydrogène sur les colonies qu'on veut déterminer. Sauf dans le cas où ces colonies sont des ferments lactiques et où la goutte reste translucide, il se forme après quelques secondes des bulles d'oxygène visibles à l'oeil nu.

La mort ne suivant que très lentement par le contact avec le peroxyde on a tout le temps d'enlever les colonies inertes de la plaque pour des cultures prochaines. Cette réaction se prête très bien à la démonstration si l'on verse une quantité suffisante du peroxyde sur la surface entière d'une plaque contenant des colonies de ferment lactique parmi d'autres espèces. J'ai découvert cette réaction en 1893 [2]). Plus tard Mr. Loew a donné le nom de »catalase« au principe inconnu dont depend la décomposition du peroxyde [3]). Par des recherches ultérieures j'ai trouvé que seulement quelques variétés de bactéries acétiques peuvent rendre la réaction douteuse pendant quelques minutes, ces variétés ne possédant qu' un faible pouvoir de décomposition [4]). Mais avec un peu de patience on verra qu'aussi tous les *Acetobacter* produisent à la fin des bulles de gaz. Dans la nomenclature de M. Loew les ferments lactiques actifs seraient donc les seuls êtres vivants à qui manque la catalase.

Une réaction importante, apparemment commune à tous les ferments lactiques actifs, mais par l'intensité de laquelle les *Lactobacillus* se distinguent des *Lactococcus,* est la production de mannite du lévulose [5]). Si l'on cultive le *Lactobacillus fermentum,* que jai étudié spécialement dans cette direction, dans de l'eau de levûre à 10% de lévulose et à 37° C. on trouvera après trois jours une acidité de c. a. 14 cM^3 d'acide normal pour 100 cM^3, si l'on évapore alors jusqu'à consistance sirupeuse

---

[1]) J'appelle »nécrobiose« de la cellule la mort du protoplasma, les enzymes restant actifs. A comparer mon travail: Further researches on the Formation of Indigo from the Woad. Proceedings Acad. of Sciences Amsterdam, 30 June 1900, pag. 114.

[2]) Naturwissenschaftliche Rundschau Bd. 8, p. 671, 1893.

[3]) Catalase, a new Enzyme of general occurrence, Washington Report of the U. S. Department of Agriculture 1901, pag. 47.

[4]) Il n'est pas douteux que dans la classification naturelle les ferments lactiques et acétiques ne soient très voisins. J'en connais une espèce intermédiaire produisant les acides lactique et acétique du sucre en égales quantités, et qui se trouve dans les tanneries de cuir à écorce de chêne. Cette espèce décompose le peroxyde d'hydrogène assez facilement.

[5]) Gayon et Dubourg, Sur les vins mannités, Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 8, p. 108, 1894. Sur la Fermentation mannitique. Ibid. T. 15, pag. 527, 1901.

on voit après un ou deux jours toute la masse du sucre non acidifié cristallisée en mannite. Chez le glucose, le maltose et le galactose la partie non acidifiée est retrouvée inaltérée. Le saccharose produit du mannite en assez grande quantité parceque l'acide lactique provoque l'inversion d'une partie de ce sucre produisant du lévulose.

Les *Lactococcus* donnent dans les mêmes circonstances de culture une beaucoup plus petite quantité de mannite, transformant, comme dans le cas précédent, le lévulose seul.

Un autre caractère marquant de nos microbes c'est qu' il n' y a que les peptones qui puissent leur servir de source d'azote, les peptones animales avec quelque difficulté, les végétales plus facilement. Ils n'ont pas le moindre pouvoir peptonisant envers les corps protéiques, en conséquent aucun d'eux ne peut liquéfier les plaques de gélatine. Enfin la croissance de nos ferments est seulement possible quand il y a des carbohydrates dans l'aliment; on chercherait donc en vain ces microbes sur les plaques de bouillon gélatinisé sans autre addition, n'importe l'ensemencement des plaques.

Il me faut encore envisager ici une autre question de quelque importance. La fermentation lactique dépend elle directement de la vie, ou peut-on démontrer la présence d'un enzyme qui transforme les carbohydrates en acide lactique?

Afin de trouver la solution de ce problème j'ai cultivé à 37° C. le *L. caucasicus* déjà mentionné, en grande quantité sur la surface d'une plaque de moût solidifié au moyen de gélose, j'enlevai les minces colonies avec une spatule de platine et de cette manière je recueillis un assez grand nombre de bactéries vivantes. Je les mis ensuite dans une boîte de verre, à côté d'un verre de montre avec du chloroforme; je les y laissai pendant une heure pour les tuer, prenant pour indice de la mort l'impossibilité de croissance dans les meilleurs milieux de culture connus [1]). Puis je mis les cadavres du *Lactobacillus* dans des solutions de divers sucres, et aussi dans du moût à des températures convenables. Comme je n'ai pu apercevoir dans ce cas aucune altération dans la réaction avec le tournesol, je dois conclure que la fermentation lactique ne dépend nullement de la présence d'un enzyme mais doit être rangée parmi les procès cataboliques, c. a. d. parmi les décompositions sous l'influence directe du protoplasme vivant, dont j'ai décrit quelques exemples ailleurs [2]).

3. *Le levain lactique de l'industrie.*

Le levain lactique de l'industrie est préparè selon diverses manières, correspondant aux divers systèmes suivis dans la fabrication de la levûre de boulanger. Les plus importants parmi ces systèmes sont la préparation de la levûre dite »de Vienne« et de la levûre dite »à air«.

---

[1]) Je sais très bien que cet indice est sujet à critique et que l'impossibilité de croître ne serait jamais considérée comme une preuve décisive de la mort pour les organismes supérieurs adultes. Cependant pour les microbes il n'existe pas d'autre réactif général démontrant l'existence de la vie hors la multiplication.

[2]) Ces Archives. Sér. II, T. 3, pag. 338, 1900.

Avant de décrire la fabrication du levain il ne sera peut être pas superflu de tracer en grandes lignes les principes généraux des dites industries. L'une et l'autre consistent essentiellement en deux fermentations alcooliques successives, la »profermentation« et la »fermentation principale«, dont la première produit la levûre semence pour la seconde. La profermentation s'accomplit dans le levain lactique qu'on mélange avec une certaine quantité de levûre de commerce qui s'y multiplie énergiquement. Le produit de la profermentation, le »levain alcoolique«, est donc la levûre semence des grandes cuves à fermentation principale, d'où l'on tire la levûre et l'alcool pour le commerce.

Dans la méthode viennoise la fermentation lactique et les deux fermentations alcooliques s'accomplissent au milieu des particules de farine de malt, de mais ou de seigle, ce qui nécessite la séparation subséquente de la levûre par tamisation. Dans ce procédé le levain lactique est donc une masse consistante qui doit être diluée avec de l'eau ou de la vinasse pour acquérir la fluidité nécessaitre à la fermentation alcoolique.

Chez la fabrication de la levûre à air au contraire, tout le travail a lieu dans du moût clair, préparé par filtration préalable, comme dans les brasseries de bière. Le levain lactique dans ce cas est donc du moût complètement liquide, acidifié par les ferments lactiques, et c'est dans ce liquide acide que s'accomplit la profermentation dont le produit est un »levain alcoolique« liquide. La fermentation principale est induite par moyen de ce levain dans du moût liquide et filtré aussi. C'est enfin par sédimentation et filtration qu'on récolte la levûre.

Les ferments actifs étant les mêmes dans les levains liquides et semiliquides des deux méthodes, il suffira de décrire mes recherches sur le levain lactique utilisé dans le système viennois, que j'ai étudié minutieusement.

On prépare ce levain de la manière suivante [1]). Environ deux parties de farine de malt sec et une partie de farine de seigle sont mélangées intimement avec la plus petite quantité possible d'eau très chaude qui peut conduire à la temperature finale de 63° C. du mélange. On obtient ainsi une masse homogène, sans grumeaux, de consistance demi-fluide, mais trop épaisse pour contracter des courants par différences de chaleurs.

La température de 63° C. est préconisée la meilleure pour la saccharification de l'amidon par l'amylase. L'infection avec le ferment lactique se fait dans la matière chaude au moyen d'une petite quantité d'un levain lactique antérieur. On laisse ensuite la pâte refroidir lentement et très paisiblement, toute secousse des cuves contenant le levain étant nuisible par la »rupture« et le »coulement« des colonies du ferment lactique qui se forment partout mais doivent rester intactes dans un bon levain. Toute la masse se refroidit dans trois jours de 63° C. à 37° ou 40° C., degré de chaleur tout près de l'optimum pour le développement du ferment (41° C.), ce qui prouve que l'acide se forme exclusivement au-dessus de cet optimum. On trouve à la fin une acidité variant entre 12 et 18 cM^3 d'alcali normal exigé pour la neutralisation de 100 cM^3 de levain. Cela n'est pas du tout le maximum d'acide qui puisse se former dans la masse. Si par exemple on abaisse la température au

---

[1]) Pour plus de détails je renvoie au travail de M. J. Effront, Etude sur le levain lactique. Annales de l'Institut Pasteur, T. 10, pag. 525, 1895.

commencement il est possible d'obtenir une acidité même de 25 cM^3. Mais ce n'est pas cette haute acidité que cherche l'industrie [1]).

En déterminant la densité d'un levain après l'avoir dilué et filtré, on la trouve, tant avant que après l'acidification, d'environ 24⁰ du saccharomètre de Balling. Mais à la fin de la profermentation qui s'accomplit dans le levain acide après l'infection avec la levûre alcoolique elle sera abaissée à 12⁰B., d'où l'on voit que le premier développement de la levûre s'accomplit en des circonstances d'alimentation et d'acidité tout à fait extraordinaires.

L'image microscopique du levain acide se distingue toujours par une grande conformité et ferait croire qu'il ne s'y trouve qu'une seule variété de bactéries. Ce sont des bacilles de 1,5 μ de largeur et d'une longueur assez variée. Tous les bacilles vivants sont transparents et homogènes; mais après la mort des granulations apparaissent ressemblant à celles qu'on remarque chez l'*Aérobacter coli.* La grande conformité microscopique n'existe qu'en apparence, car l'analyse bactériologique montre que le levain contient un très grand nombre de variétés de ferments lactiques qui toutes sont plus ou moins héréditairement constantes lors de la multiplication.

Aussi on se tromperait bien en croyant que le levain lactique industriel est un produit de grande égalité. Prenant pour mesure les titres en acidité obtenus dans les mêmes temps, par exemple en trois jours, on trouve dans la pratique des divergences considérables. Ces divergences ne sauraient être expliquées par les différences de composition des farines, mais elles sont intimement liées avec la condition bactériologique du levain. Ainsi on peut rencontrer dans les levains lactiques de l'industrie en pâtes des titres en acide variant entre 15 et 25 cM^3 d'acide normal pour 100 cM^3 de levain, les conditions de fabrication étant parfaitement égales. Ces différences se répètent, et même s'agrandissent par l'inoculation au laboratoire de très petites quantités de ces levains dans du moût frais liquide, ou dans des pâtes de farine, ce qui sera démontré dans § 4.

Les ferments lactiques ne produisent jamais de spores; c'est pourquoi les moûts ou pâtes de farine bouillies ne contractent la fermentation lactique que par une infection de dehors. Mais l'étude de la distribution de ces ferments a démontré que les formes actives caractéristiques pour le levain ne se rencontrent dans la nature que très rarement, et que seul dans les distilleries elles sont fréquentes. Ce sont donc, pour ainsi dire, des plantes cultivées qui prolongent leur existence dans des conditions exceptionnelles, et il est certain que les farines brutes ne les contiennent pas ou dans un nombre extrêmement restreint. L'expérience des praticiens est en accord avec cette observation, car ils savent que dans une distillerie ou dans une fabrique de levûre nouvellement installée il est impossible de faire un bon levain de malt sans infection par un levain préalable. Aussi dans les laboratoires on ne voit jamais apparaître une fermentation lactique sans infection artificielle. Tout au contraire, plusieurs autres fermentations dont les germes sont répandus partout, particulièrement les fermentations butyrique, lacto-acétique et à *Aërobacter,* se déclarent spontanément dans les moûts et les pâtes de farine sous diverses circonstances.

[1]) Quand dans la suite je ferai mention d'acidité j'en indiquerai toujours la proportion de la même manière. Une acidité de 10 cM^3 signifie donc la présence de 0,9 % d'acide lactique; de 11,1 cM^3 la présence de 1 % d'acide, etc.

Mr. Effront, qui a discuté (l. c.) habilement les différentes théories du levain, est venu à la conclusion que le but principal en est de porter la levûre, au moyen de la concentration élevée des aliments et de l'acidité pendant la profermentation, à un état de grande activité lors de sa transmission dans les cuves de la fermentation principale. Quoique en principe, j'accepte cette manière de voir, il me semble que Mr. Effront n'a pas suffisamment reconnu l'action vraiment remarquable du levain sur toutes les fermentations nuisibles susdites. C'est un fait acquis, — point de départ pour un expériment de laboratoire recommandable, — que toutes ces fermentations, aussi bien dans le moût liquide que dans les pâtes de farine brutes ou saccharifiées, ne se déclarent pas lors de la présence d'un assez grand nombre de germes du ferment du levain lactique ou du *Lactobacillus caucasicus* [1]). L'explication se trouve dans la grande intensité avec laquelle les deux dits ferments transforment le sucre en acide lactique, nuisible aux germes des fermentations étrangères.

Encore une autre circonstance biologique réalisée dans un bon levain en augmente la grande valeur pour l'industrie. C'est le fait que la méthode du levain élimine d'une manière assez complète de la levûre de boulanger, produit d'après le système viennois [2]), les *Lactobacillus* de corruption, c. a. d. les *L. caucasicus, fragilis* et *conglomeratus* et peut être d'autres espèces [3]). La biologie de tous ces microbes étant très imparfaitement connue, l'industriel pourrait seulement être guidé par des tentatives multiples de pure empirie pour les combattre. Au laboratoire il n'est pas possible de reproduire exactement les manipulations de l'industrie, et c'est pourquoi l'explication du fait est encore incertaine. En effet dans mes propres tentatives avec un mélange des *L. caucasicus* et *fermentum* j'ai en vain cherché des conditions de culture qui éliminassent totalement la première espèce, tandisque dans l'industrie c'est toujours le L. fermentum qui remporte la victoire décisive.

Pour bien comprendre l'utilité du levain dans la purification de la levûre il faut encore fixer l'attention sur l'anaérobiose presque complète de la cellule pendant la profermentation, d'où il résulte que les germes purement aréobies, présents dans la levûre semence, c'est à dire les bactéries acétifiantes, les *Mycoderma* et les moisissures ne peuvent se multiplier, tandisque chaque cellule de la levûre elle-même produit moyennement trois descendants. Le nombre des nouvelles générations pendant la fermentation principale est seulement deux, et cela pendant une aération beaucoup plus abondante. La comparaison de ces nombres de multiplication peut servir à éclaircir la grande influence de l'état de nutrition de la cellule dans le levain sur le rendement final.

---

[1]) Les autres *Lactobacillus* et les *Lactococcus* ne possèdent pas ou seulement a un moindre degré le pouvoir d'empêcher les fermentations étrangères.

[2]) Chez la levûre à air les conditions ne sont par les mêmes, parceque les germes de corruption n'y sont pas identiques à ceux de la levûre viennoise.

[3]) Au moins dans les usines où cette méthode se trouve dans sa perfection. Dans les petites fabriques, par exemple à Schiedam, il n'y a pas question de cette perfection, et il est bien connu que la levûre fabriquée là est plus susceptible de corruption que celle des grandes installations. Les méthodes microbiologiques démontrent que les germes de corruption sont dans ce cas les *Lactobacillus caucasicus, fragilis* et *conglomeratus*.

Je ne saurais finir cet aperçu de la signification du levain, sans parler de la fermentation alcoolique spontanée qui se produit presque toujours dans les pâtes de farine acidulées et exposées à des températures entre 28° et 37° C. Bien loin d'entraver cette fermentation dans la masse non acidulée les ferments lactiques la favorisent au plus haut degré par la génération d'acide, ainsi produisant un véritable »levain alcoolique spontané«[1]. On peut tirer de ce levain plusieurs espèces de »levûres sauvages«, la surface aérée du mélange se couvrant de *Mucor,* spécialement de *M. racemosus.* Mais il va sans dire que la fermentation alcoolique considérée ici, quoique sous l'influence de levûres étrangères, a peu de signification pour l'industrie qui prépare son levain alcoolique par l'ensemencement du levain lactique avec la levûre de boulanger, elle-même toujours riche en levûres sauvages. Aussi il faut considérer que le levain lactique est préparé entre les températures de 63° et de 40° C., ce qui exclut presque complètement la reproduction des levûres alcooliques et tue, même la levûre de boulanger, tandisque le *Saccharomyces fragrans,* qui reste vivant seulement dans la surface du levain et auquel je reviendrai tout à l'heure, n'est aucunement nuisible.

Abstraction faite de l'alimentation de la cellule levûre, nos observations sur la signification du levain lactique et du levain alcoolique qui en résulte par la profermentation, se résument ainsi:

Par l'anaérobiose dans le levain pendant la profermentation la levûre alcoolique est purifiée de la plupart des germes aérobies de corruption.

Aussi les plus redoutables ferments de »corruption acide« de la levûre, les *Lactobacillus caucasicus, fragilis* et *conglomeratus* sont éliminés de la levûre par l'usage d'un bon levain.

Les ferments lactiques propres au levain sont, par un bon travail au-dessus de leur température optimum, mis dans un état presque parfaitement inoffensif pour la levûre.

Dans les moûts liquides et les pâtes de farine la présence du *Lactobacillus fermentum* rend impossible la fermentation butyrique et les autres fermentations anaérobies étrangères.

4. *Expériments d'infection au laboratoire avec le lavain lactique.*

Le levain brut employé dans les expériments que je vais décrire, contient souvent des levûres alcooliques et particulièrement une espèce »sauvage« qui ne fait pas fermenter le maltose, mais bien le saccharose, et qui est aussi très commune dans toutes les levûres hollandaises. Je l'appelle *Saccharomyces fragrans* puisque lors de sa croissance en présence de glucose elle dégage un peu d'acétate d'éthyle. Elle mérite quelque attention à cause de sa grande vitalité et de son très haut maximum de croissance, trouvé un peu au-dessus de 41° C. Pourtant j'ai réussi à tuer cette levûre, sans dédommager les *Lactobacillus,* en chauffant les levains employés pour les expériments d'infection, pendant un quart d'heure à 65° C. On peut se servir d'une chaleur plus forte encore, les *Lactobacillus* du levain supportant même la température de 70° C. pendant 25 minutes, quand ils se trouvent dans du

[1]) En Hollandais »zuurdeeg«.

moût liquide. Je veux appeler »lactisation« cette manipulation qui permet de séparer très facilement les *Lactobacillus* dudit *Saccharomyces* comme aussi de tous les autres microbes. Les espèces sporogènes sont ici sans signification puisqu'elles ne se développent pas en présence de l'acide produit par les ferments lactiques eux-mêmes.

Quant à la méthode de culture suivie dans les expériments je préfère du moût liquide d'une densité de 10° Balling. L'air ayant une influence décisive sur l'acidification il est prudent de comparer les différences entre les cultures en matras à fond plat et celles en vase clos. Pour les dernières on peut employer de petites bouteilles qu'on remplit tout à fait et sans bulle d'air sous le bouchon à l'éméri. Le moût inoculé avec le levain est placé dans l'étuve à 37° C.

La lactisation doit être pratiquée dans tous les cas où l'on fait les cultures à des températures de 37° C. ou plus bas, si non, les levûres alcooliques rendant l'acidification incertaine. Pour les expériments conduits au-dessus de 40°, où la fermentation alcoolique est presque complètement impossible, la lactisation n'est pas absolument nécessaire mais aussi alors il est préférable de s'en servir.

Après ces observations préliminaires nous pouvons procéder à notre sujet.

Si l'on fait des prises lactisées sur du levain industriel à divers endroits d'une même cuve, par exemple à la surface, au milieu, aux côtés, etc., pour en infecter les moûts ou les pâtes de farine au laboratoire, on trouvera de grandes différences entre les acidités obtenues et cela d'après la règle suivante: Toutes les localités des cuves refroidies le premier, contiennent des bactéries d'un grand pouvoir acidifiant; toutes celles qui se sont refroidies le dernier contiennent des bactéries d'une faculté fermentative atténuée. La difficulté de faire de bonnes prises dans une masse semi-fluide rend cette manière d'expérimenter tant soit peu incertaine. Comme pourtant la question est de grande signification j'ai fait là-dessus de longues séries d'expériments qui m'ont donné la certitude que la dite règle est tout à fait correcte. Aussi nous en trouverons la corroboration et l'explication lors de la discussion des résultats obtenus avec les cultures pures, ce qui rend superflu de donner des chiffres ici.

Mais les expériments d'infection avec du levain démontrent une autre circonstance non moins importante.

C'est qu'il existe une variation notable entre les prises originaires de diverses cuves de levains quand ceux-ci ont été agités si énergiquement que les différences des localités susdites en disparaissent, et que chaque prise de la même cuve, comme un étalon moyen, donne environ le même résultat en acidité. C'est ce qui s'ensuit des expériments exposés cidessous, qui ont été faits d'après la méthode décrite plus haut, soit dans des matras à fond plat (»à l'air«), ou dans de petites bouteilles fermées (»sans air«). Le volume des moûts infectés pour chaque expériment était de 50 à 100 cM³.

Avant de décrire l'expériment principal, je dois remarquer que la quantité de matière employée pour l'infection est seulement appréciable pendant les deux premiers jours; au troisième jour elle peut être négligée, ce que l'on voit des données suivantes:

Quantité de levain inoculé.	Date de l'infection.	Date du titrage.	Titre en acide.	
			A l'air.	Sans air.
Traces	24 Juin	26 Juin	8	11
		27 „	12	13
2 Gouttes	24 „	26 „	9,5	11,5
		27 „	11	12
20 Gouttes	24 „	26 „	9,5	12
		27 „	12	12

Les chiffres suivants peuvent servir pour montrer l'influence de l'origine des ferments. Les titrages ont été exécutés après trois jours de culture.

Provenance des ferments employés pour l'inoculation.	Acidité obtenue après trois jours dans du moût liquide.	
	A l'air.	Sans air.
1re Cuve	8	12
2me „	12	14
3me „	7	10
4me „	8,5	11
5me „	6	8

On voit de ce tableau que l'influence de la cuve dont on a pris les ferments pour l'infection est considérable. Un autre résultat qui s'en dégage c'est que l'air entrave l'acidification. Pour bien apprécier les chiffres il faut savoir que si les ferments dans le levain avaient possédé toute leur énergie, l'acidité aurait monté au troisième jour, dans ces conditions de culture, jusqu'à 17, aussi bien à l'air que sans air, tandisque elle est restée maintenant à 13 au plus haut et est arrivée dans quelques cas, seulement à moitié de la hauteur qu'elle aurait pu atteindre avec des ferments actifs. Mais je n'ai jamais pu parvenir au chiffre 17 hormis les cas que je me servais de cultures pures.

On voit de ce qui précède combien grandes sont les différences qu'on doit attendre dans ces sortes d'expériments.

Il serait fatiguant de multiplier ces exemples; seulement il me reste à remarquer que j'ai fait une longue série d'expériments analogues, dans lesquels les acidités ont

varié entre 1 cM³ et 15 cM³ d'alcali normal pour 100 cM³ de moût, et que dans les transports successifs les mêmes différences se sont reitérées, c. à. d. que le pouvoir acidifiant des ferments est dans chaque cas héréditaire. Je dois avouer que ces résultats m'ont paru obscurs jusqu'au moment où j'en ai trouvé l'explication dans l'influence de la chaleur et de l'anaérobiose sur la variabilité du ferment lactique.

Les conclusions tirées des expériments d'infection avec le levain lactique de l'industrie contenant exclusivement les ferments lactiques sans autres microbes, sont les suivantes:

1⁰. Il y a une grande différence entre les acidités obtenues avec des matériaux pris dans la même cuve mais à des localités qui se sont refroidies différemment.

2⁰. Il existe aussi une différence considérable entre les acidités obtenues avec les étalons moyens pris sur différentes cuves de levain.

3⁰. Ces différences sont héréditaires. Elles sont beaucoup plus faciles à observer dans les expériments à moût liquide dilué, que dans les pâtes de farine.

5. *Le Lactobacillus delbrücki*[1]).

Il n'est pas du tout difficile d'isoler des ferments lactiques du levain. Pour moi, je l'ai déjà fait en 1885, et Mr. Leichmann, qui expérimenta en 1896[2]), a donné une courte description de la variété trouvée le plus facilement, et qui'l nomma *Bacillus delbrücki*. Je veux accepter ce nom, mais je dois faire observer que je l'appliquerai non pas à une seule variété, mais à toutes celles qui se laissent isoler facilement à l'air de tout étalon de levain par la méthode du moût à gélose. Pour moi le nom de *Lactobacillus delbrücki* comprend donc toute une série de formes très proches entre elles et héréditairement assez constantes.

Les différences morphologiques entre ces variétés sont petites, c'est pourquoi la description d'une seule en peut donner une image assez exacte. La distinction se déclare dès qu'on va comparer des cultures de ces variétés dans du moût liquide aéré et sans air, et qu'on dose l'acidité obtenue dans ces circonstances. Les colonies sur le moût à gélose sont blanches ou jaune-clair, et plus ou moins crénélées au bord. Leur grandeur est très variable mais tant soit peu constante pour la même variété. Leur temperature minimum de croissance étant au-dessus de 25⁰ C., il n'est pas possible de les cultiver sur gélatine. Pourtant avec des matériaux dérivés de cultures liquides ou sur gélose, on peut se convaincre que ni la gélatine, ni d'autres corps protéiques n'en peuvent être peptonisés, ce qui est d'intérêt pour la théorie du levain.

L'image de *L. delbrücki* est très intéressant et caractéristique *quant aux colonies croissant sur gélose à moût a 37⁰ C., et fraîchement isolé d'un levain industriel.* Sur ce substratum les bacilles peuvent devenir très larges et en même temps plus ou moins allongés, ce qui leurs donne un aspect irrégulier. Cette irrégularité est encore rehaussée par les formes fantasques de la majorité des individus qui sont contournés ou enroulés, ou se présentent comme des cercles. La largeur moyenne des bacilles est environ de 1,5 μ, mais dans les cultures renouvelées sur un substratum solide frais

[1]) Le nom correct de cette bactérie serait *Lactobacillus fermentum* var. *delbrücki*. Pour la simplicité j'écris seulement *L. delbrücki*.

[2]) G. Leichmann. Ueber die im Brennereiprocesse spontan auftretende Milchsäuregärung. Centralblatt für Bacter. 2te Abth. Bd. 2, pag. 284, 1896.

on remarque des divergences vraiment extra-ordinaires entre les individus de la même colonie qui peuvent varier de 1,2 à 3 μ; aussi il s'observe plusieurs articules dont la largeur égale ou même dépasse la longueur. Dans les cultures liquides on n'observe rien de cette polymorphie, tous les individus étant alors des bacilles droits seulement variant en longueur et mesurant environ 0,6 à 0,7 μ en largeur. Dans les cultures vieillies on voit apparaître dans beaucoup d'individus des contours fort prononcés et deux ou trois granules polaires ou médianes; ces individus ont perdu leur pouvoir de reproduction.

Quant aux phénomènes de la nutrition avec les carbohydrates et les corps azotés, ils correspondent assez exactement à ceux du *L. fermentum* et seront discutés dans § 6. Il est vrai que la respiration, si différente pour les deux formes, doit nécessairement influer sur la nutrition proprement dite, et c'est l'acidification, déjà traitée ailleurs, qui en donne une idée approximative.

J'ai reconnu que les différentes variétés du *L. delbrücki* ne constituent pas l'agent inaltéré de la fermentation lactique du levain et qu'il est impossible de produire le levain industriel parfait par la culture pure ni d'une seule variété, ni de plusiers variétés ensemble. La raison en est que l'acidité reste de beaucoup trop au-dessous du titre désiré dans les trois jours que l'industrie accorde pour la fabrication.

Plusieurs tentatives ont été faites dans cette direction en suivant rigoureusement les règles prescrites par l'industrie, c. à. d. en inoculant à environ 63° C. avec la culture du ferment, soit les pâtes de malt, soit les moûts liquides à 50° C. et laissant refroidir jusqu' à 40° C. dans trois jours, mais tous mes efforts ont été infructueux, l'acidité définitive restant très basse, 1 à 5 cM³, par exemple. De nouvelles inoculations pratiquées avec ces levains artificiels donnent le même résultat, pour peu qu'elles ne résultent pas dans la perte totale du ferment et de l'acidification ce qui est le cas ordinaire. Il est donc certain que le *L. delbrücki* n'est pas identique au ferment actif d'un bon levain.

Pourtant nous verrons plus loin que le *L. delbrücki* est un descendant direct du ferment réel du levain, comme celui-ci se dérive en certaines circonstances du premier. J'ai fait les expériments qui ont démontré ce fait curieux non seulement avec des moûts liquides mais aussi avec des pâtes de farine de malt et de seigle, préalablement bouillies ou stérilisées.

Pour montrer combien étranges sont au premier abord les titres en acide produits par le *L. delbrücki*, je donne ci-joint un tableau qui, à gauche, montre l'origine de la culture de cette bactérie prise pour l'infection, et à droite, les acidités après trois jours à 37° C. dans du moût liquide, ou dans une pâte de farine semi-fluide saccharifiée et stérilisée, saccharifiée et pasteurisée et non saccharifié non stérilisée. Dans les pâtes l'air n'a pas accès. Les matériaux d'infection *b, c, d,* à gauche proviennent des cultures *(b), (c), (d),* indiquées à droite.

Pour les pâtes pasteurisées je me suis servi de préparations faites de la manière ordinaire suivie dans la fabrication du levain. Mais ici une précaution est de rigueur: toute infection spontanée par le ferment lactique lui-même doit être exclue.

C'est pourquoi ces expériments ne peuvent s'opérer qu'au laboratoire et non pas dans une fabrique où ces ferments sont tellement répandus dans l'air, sur les ustensiles et sur le bois des cuves qu'ils infectent les moûts et les pâtes presque certainement. Dans le laboratoire on ne rencontre pas cet inconvénient; tout au contraire,

quand on y veut préparer un bon levain de farine on est toujours obligé d'infecter au préalable avec un peu de levain lactique. C'est, nous l'avons vu déjà, que les ferments lactiques actifs sont rares dans la nature et manquent presque absolument dans les farines.

On voit du tableau combien les expériments avec le *L. delbrücki* sont incertains et combien il est difficile d'empêcher la fermentation butyrique, ce qui réussit sans exception en cas d'infection avec le *L. fermentum*.

Origine du *Lactobacillus delbrücki* pris pour l'infection.	Acidité en cM^3 d'alcali normal par 100 cM^3 de moût				
	Moût liquide stérilisé.		Pâte de farine.		
	Aéré.	Sans air.	Pasteurisée.	Stérilisée.	Non saccharifiée.
a. Culture jeune sur moût à gélose	1 *(b)*	5,6	Fermentation butyrique	7	Fermentation butyrique
b. Culture en moût en matras à large fond, à acidité 1	2 *(c)*	6 *(d)*	Fermentation butyrique	7,5	Fermentation butyrique
c. Culture en ballon, peu aérée; acidité 2	3,5	7	8	8,2	Fermentation butyrique
d. Culture dans bouteille, sans air; acidité 6	6	8,5	8,6	9	9

Le seul résultat tout à fait clair qui se dégage de ce tableau c'est que l'anaérobiose favorise plus ou moins la production de l'acide. Mais il est clair aussi que les conditions de culture changent énormément le pouvoir acidifiant de la postérité immédiate de notre bactérie. Quoiqu'il soit vrai qu'à la première infection on n'obtient jamais un bon levain avec le *L. delbrücki*, pourtant, en répétant les inoculations avec cette bactérie de pâte en pâte à 37° C., ou dans le moût liquide de bouteille close en bouteille close, de même à 37° C., j'ai enfin obtenu de bons levains d'une acidité de c. a. 17 cM^3 au quatrième ou cinquième transport. Si l'inoculation avec cette forme régénérée se fait alors à 63° C., en refroidissant jusqu' à 40° C., l'acidité devient satisfaisante pour un bon levain en trois jours, mais les bactéries perdent en même temps leur faculté fermentative et ne sauraient être employées de nouveau.

Tous ces phénomènes complexes se sont élucidés par l'étude des variations héréditaires, induites dans les cultures du *L. delbrücki* et de son congénère *L. fermentum*, par l'influence de la chaleur et de l'aëration, variations qui seront traitées dans les §§ 7 et 8.

6. *Le Lactobacillus fermentum.*

Quoique par la méthode de culture aérobe sur substratum solide appliquée au levain on obtienne pour l'ordinaire le *Lactobacillus delbrücki*, il est possible en cer-

tains cas, d'en tirer une bactérie spéciale et très intéressante qui est l'agent inaltéré du levain. J'appelle cette forme *Lactobacillus fermentum*; des études exactes ont démontré que les différentes variétés du *L. delbrücki* en tiennent leur origine.

Pendant longtemps je ne savais cultiver cette bactérie bien que j'en eusse entrevu l'existence; la cause en était la suivante. Quoique toujours présente dans le levain en très grand nombre elle perd pendant la maturation de celui-ci la faculté de pouvoir croître à l'air, ce qui rend impossible de la cultiver sur des plaques de moût à gélose aéré.

Cependant, si l'on répète les tentatives avec des levains encore jeunes, par exemple de 36 heures et en cultivant à 37° C., on voit apparaître, en certains cas, parmi les formes opâques du *Lactobacillus delbrücki* de très petites colonies translucides comme des gouttelettes d'eau, qui sont la forme cherchée.

Transportées sur du môut à gélose frais il n'est pas difficile d'en garder des cultures successives héréditairement constantes, pourvu qu'on prenne les précautions suivantes. Il faut faire des cultures à piqûre, ce qui rend possible la croissance a peu près anaérobie; réinoculer quand la culture est encore jeune, par exemple après une semaine tout au plus, pour prévenir l'influence sur les cultures successives des produits d'excrétion des inoculations précédentes; enfin, cultiver au-dessons de 41° C. Par l'omission de ces précautions la bactérie dégénère dans le cours des mois et produit des formes analogues aux différentes variétés de *L. delbrücki*.

L'étude attentive de cette curieuse espèce a montré que le caractère principal qui règle sa grande sensibilité pour les influences extérieures est un certain degré de microaérophilie, pas assez developpée pour parler d'anaérobiose. Toutefois cette qualité est peu apparente et échappe tout à fait à l'observateur qui n'a pas prolongé ses investigations sur cette bactérie pendant plusieurs mois consécutifs.

Mais commençons-en l'étude par les caractères morphologiques. Les colonies sur moût à gélose, développées à 37° C., consistent de bacilles immobiles d'une forme très irrégulière, pour la plupart très courts, bien souvent aussi longs que larges, mesurant environ 1,5 à 2 μ, et présentant alors l'image de grandes micrococques polyédriques, formant des chaînettes plus ou moins articulées ou tordues. Dans les cultures successives sur le même milieu solide ces caractères se montrent assez constants.

L'aspect microscopique se change dans les cultures liquides et semiliquides comme dans le levain, où l'on voit apparaître la forme bacillaire, commune à tous les *Lactobacillus*. C'est là que la largeur des cellules est diminuée et devient sensiblement la même pour tous les individus, de 0,7 à 1 μ; quant à la longueur elle oscille entre des limites bien distantiées, produisant parfois de courts articules, parfois des fils de longueur considérable. Ces différences se rapportent au degré de richesse du milieu de culture en oxygène dont l'absence tend à allonger les individus.

Notre bactérie ne produit pas de spores, caractère général de tous les *Lactobacillus* ainsi que des *Lactococcus*. Pourtant sa resistance à la température est considérable, comme nous l'avons dejà vu.

Si l'on sème une petite prise dans un matras à fond plat, contenant une mince couche de moût bien aéré, on voit paraître au fond de petites colonies, s'élargissant en cercle et s'écoulant comme le ferait un tas de sable sous l'eau. La multiplication dans ces colonies étant considérable, tout le paroi du verre se couvre en deux jours d'une couche de courts bacilles.

Tout autre est l'aspect des cultures en moût à exclusion d'air. La plus simple manière d'obtenir ces cultures anaérobies est la suivante. Des tubes à essai ordinaires sont à moitié remplis de moût stérilisé où nage une petite boule de verre, dont le diamètre est à peu près celui du tube, ce qui empêche suffisamment l'entrée de l'air. Avant l'usage on fait bouillir jusqu'à ce que la dernière trace d'air soit éloignée, refroidit rapidement, infecte avec le fil de platine et transfère les éprouvettes à l'étuve de 37° C. Si l'on veut éliminer l'oxygène plus rigoureusement que dans ladite manipulation on peut employer de petites bouteilles parfaitement bouchées et remplies tout à fait de moût dont l'air a été éloigné par ébullition.

Il est très intéressant d'observer les différences dans les phénomènes de culture corrélatifs au degré plus ou moins élevé de l'aération. Quand l'air peut librement entrer dans le moût, les bactéries, comme nous l'avons vu, s'enfoncent aussitôt. Dans les éprouvettes et les bouteilles closes, au contraire, les bactéries restent en suspension pendant les trois premiers jours et il se déclare une forte production de gaz qui échappe en petites bulles quand on secousse les cultures. Ce gaz est de l'acide carbonique tout à fait pur sans trace d'hydrogène ou de méthane; la quantité en est en proportion inverse à celle de l'oxygène en solution mais bien plus grande. Cela se fait observer le plus facilement par la culture en eprouvettes avec boules de verre, remplies de moût qui a été exposé à l'air pendant un plus ou moins grand nombre d'heures, le plus de gaz se dégageant dans les tubes les moins aérés. La formation du gaz n'amoindrit en aucune manière le rendement en acide lactique au moins jusqu'à un certain limite minimum d'aëration; plûtôt, tout en accord avec la règle déjà mentionnée lors des expériments avec le levain brut, l'anaérobiose favorise l'acidification [1]).

Dans l'industrie du levain on n'observe ordinairement rien de cette production d'acide carbonique. Pour la constater avec certitude il faut abaisser la température à laquelle on travaille dans les fabriques. Si l'on prend un étalon d'un levain jeune, par exemple de 12 heures, et l'agite bien pour que les colonies perdent leur cohérence et acquièrent plus de points de contact avec la pâte, puis le met à l'étuve à 37° C., on verra le levain se transformer bientôt en une masse poreuse, on pourrait dire mousseuse, par l'abondante production d'acide carbonique.

L'acidité obtenue avec le *Lactobacillus fermentum,* transporté dans du moût liquide dont la densité est de 10° au saccharomètre de Balling et qui a été gardé pendant trois jours à 37° C., devient au plus 17 cM³. En culture anaérobie seulement une très petite quantité de l'acide, environ 1% de l'acidité totale, est volatile et consiste pour la majeure partie en acide acétique. Cultivé à aération profuse, par exemple dans des flacons à fond plat, l'acide produit par le *L. fermentum* est l'acide lactique pur sans acide volatil. Si on prolonge les cultures, en inoculant toujours à l'air et à 37° C., on trouve que l'acidité reste constante à ce chiffre pendant des semaines successives. En cultivant dans des bouteilles fermées ou dans des tubes à essai à boule de verre nageant sur le moût, la température étant tenue à 37°—41° C.

---

[1]) Les corps produits du molécule de sucre à côté de l'acide carbonique sont encore inconnus. Peut être ce sont des congénères du mannite, mais le mannite lui-même, comme nous l'avons vu, est seulement un produit du lévulose tandisque l'acide carbonique se développe de tout sucre assimilable.

au plus, on voit l'acidité se diminuer peu à peu jusqu'à 15 cM³., pour s'arrêter à ce chiffre ce qui prouve que l'aération est presque, mais pas tout à fait sans influence sur la production d'acide, l'air qui se dissout dans le moût étant certainement favorable [1]).

En comparant ces acidités à celles qu'on a obtenues en inoculant le moût liquide avec des prises des levains crus, donnés page 228, on remarque une grande différence. En premier lieu l'acidification avec les cultures pures est plus haute et en second lieu l'aération retarde la production d'acide beaucoup plus chez les inoculations crues que chez celles à cultures pures. Ce fait très important pour l'élucidation de plusieurs phénomènes complexes dans l'industrie de levûre, mais qui ne peuvent être considérés ici, doit être expliqué par le rôle des *Lactobacillus delbrücki,* présents lors de l'inoculation avec le levain cru, nommément par sa concurrence pour l'aliment azoté avec le *L. fermentum.* Tout comme le *L. fermentum* le *L. delbrücki* ne trouve d'autre source d'azote dans un moût de 10° Balling que les maltopeptones, qui n'y sont pas comme le maltose en grande profusion mais manquent bientôt, étant complètement absorbées par les divers ferments lactiques. En absence du *L. delbrücki* toute la quantité de peptone disponible peut produire des individus de *L. fermentum* très actifs et produisant, même à aération complète, beaucoup d'acide. Mais lors de l'inoculation avec le levain cru les *L. delbrücki* qui y sont toujours en grande abondance s'emparent partiellement des peptones entravant ainsi le développement du *L. fermentum,* et leur activité fermentative étant bien moindre que celle du dernier on trouve une acidité moyenne de ce que les deux espèces pourraient produire seules.

On comprendra aisément que ces phénomènes ne se déclarent pas avec une égale netteté quand, au lieu de moût liquide à la petite densité de 10° B., on emploie un moût plus concentré ou une pâte de farine destinée à la préparation de levain, qui tous deux contiennent plus de maltopeptones et peuvent donc, en cas d'inoculation mixte, perdre plus de cette nourriture pour en former des individus de *L. delbrücki,* tout en ayant assez encore en réserve pour produire de nouveaux individus actifs du *L. fermentum.*

Il n'est pas absolument nécessaire de cultiver le *L. fermentum* dans le moût; il croît aussi très bien dans de l'eau de levûre sucrée, dans de la vinasse sucrée, enfin, dans des infusions des radicelles de malt (en hollandais »moutkiemen«), avec divers sucres. Les meilleurs sucres pour son alimentation sont le glucose, le lévulose le maltose et le saccharose. Le sucre de lait est très difficilement assimilé. Dans le lait lui-même il n'y a pas de développement ou seulement une croissance très lente, ce qui s'explique par l'infériorité de l'aliment de carbohydrate ainsi que de l'aliment azoté. La remarquable transformation du lévulose en mannite, déjà mentionnée § 2, est accompagnée de la même production d'acide que dans les solutions de glucose. Le mannite lui-même n'est pas acidifié. Si l'on cultive en vase clos dans de la vinasse à 10% de saccharose et à 37° C., on obtient un liquide très mousseux, d'une acidité agréable et bien acceptable comme boisson.

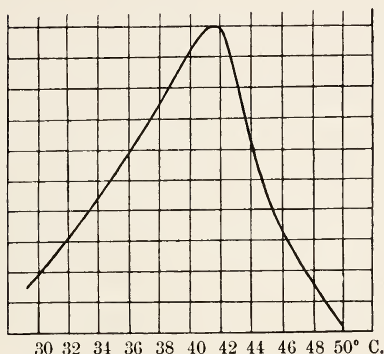
---

[1]) Si l'on cultive le *L. fermentum* sur la surface de plaques solides de moût à gélose c. a. d. dans les circonstances les plus favorables d'aération, et si après plusieurs jours on fond la plaque et titre l'acidité, on trouve celle-ci très petite, de 3 à 5 cM³. d'acide normal pour 100 cM³. du liquide au plus, ce qui prouve la microaérophilie de notre ferment d'une manière frappante. Mais ce fait est sans importance pour la discussion, des phénomènes qui s'accomplissent dans le moût liquide.

Dans les liquides tout à fait artificiels, par exemple de l'eau de conduite sucrée et additionnée de phosphate potassique et de divers corps azotés, c'est seulement le peptone qui puisse provoquer le développement du ferment. Ni l'asparagine, ni les sels ammoniacaux, ni les nitrates ne peuvent servir de source d'azote. Mais aussi avec la peptone la multiplication dans les liquides artificiels est pénible en comparaison avec les liquides organiques plus compliqués que nous avons considérés.

Les relations du *L. fermentum* avec la chaleur étant d'une importance spéciale, voici des expériments pour déterminer la température optimum de la croissance mesurée par les titres d'acidification.

Comme toujours l'aliment était du moût de 10° Balling, stérilisé et aéré, dont furent remplis des tubes à essai jusqu' à trois quarts. Ces tubes nageaient dans de grands bains-marie, pour lesquels on employait des vases cylindriques de verre, remplis d'eau et tenus à une température constante par un thermorégulateur. Trois de ces vases à différentes températures servaient à la fois. L'infection se faisait chaque fois avec le même nombre de petites gouttes de même grandeur d'une jeune culture du *L. fermentum* en moût. On commençait par chercher la température optimum en mesurant l'acidité obtenue après 24 heures à diverses températures; cet optimum fut trouvé à 41° C. ou à 42° C., la différence entre ces deux températures étant inappréciable. Ensuite on faisait un assez grand nombre de titrages d'acidité pour construire une courbe qui donnât la relation cherchée. Dans la figure on a pris l'acidité trouvée à la température optimum, comme 100 et on en a calculé par la règle à trois les autres ordinates. Pour fixer davantage les idées je donne aussi la liste de quelques acidités en cM³ d'alcali normal, trouvées après 24 heures à diverses températures, dans 100 cM³ de moût ordinaire de 10° Balling.



La température et l'acidification par *L. fermentum*.

Température	8°	30°	36°	39°	41°	42°	43°	46°	48°	50° C.
Acidité	2	6,5	9,5	10	10,5	10,5	8	3,5	1	0.

Le minimum est tout près de 25° C. C'est là un point important car il s'ensuit qu' à la température de la fermentation alcoolique principale dans l'industrie de levûre, qui est au commencement 23° C. et s'élève jusqu'à 28° à la fin, le *L. fermentum* peut encore se multiplier et acidifier sensiblement. Le maximum se trouve à 50° C. dans le moût liquide; cependant, dans les pâtes de farine j'ai observé encore un développement appréciable à 53° C. On voit de cette courbe combien sont erronés les nombres donnés par M. Maercker [1]) et M. Stammer [2]) qui croient, sur

[1]) Handbuch der Spiritusindustrie, 5te Ausg., pag. 490, 1891.
[2]) Branntweinindustrie, 2te Ausg., pag. 555, 1895.

l'autorité de M. Delbrück[1]), que l'optimum de l'acidification se trouve à 50° C., tandisqu'en réalité il est tout près de la température optimum de croissance, c. à. d. près de 41°. M. Hayduck[2]) a tâché de faire disparaître cette discordance en admettant qu'il y a une grande différence entre l'acidification par les ferments tout formés et l'acidification par les ferments en développement. Mais, au fait, l'explication de l'erreur dans la vue de M. Delbrück paraît plus simple: il se laissait tromper par les grandes différences de température au milieu, à la surface et aux côtés des cuves industrielles. Il en a pris la moyenne, oubliant qu'au milieu des cuves, où la température reste toujours très haute, non loin de 50° C. à la fin de la fermentation, il y n'a presque point de développement du ferment ni d'acidification. Aussi il lui a échappé que le point essentiel pour l'industrie est le travail au-dessus de la température optimum.

7. *Transformation du Lactobacillus fermentum en L. delbrücki.*

Je vais maintenant démontrer que les différents bacilles du levain se laissent transformer les uns dans les autres. Commençons par la transformation du *L. fermentum* en *L. delbrücki.* J'y ai réussi de deux manières: Par la culture à des températures au-dessus de l'optimum, et par la culture prolongée à aération très profuse.

La seconde méthode exige beaucoup de temps et ne sera pas discutée ici, par la première le résultat ne se laisse pas longtemps attendre. Voici les expériments.

Le 29 Juin un matras à fond plat contenant une couche de moût liquide d'une densité de 10° Balling fut inoculé avec une jeune culture de *Lactobacillus fermentum* et posé dans l'étuve à 48° C., c. à. d. 7° C. environ au-dessus de l'optimum. La végétation était assez active, ce qui se manifestait par la production d'un sédiment considérable de bactéries, mais l'acidité n'atteignait que 5,5 cM³,. tandisqu' à 40° C. elle aurait monté à 17 cM³.

Le premier Juillet cette culture fut ensemencée sur gélose à moût et gardée dans l'étuve à 37° C. Déjà après 24 heures il y avait une grande profusion de colonies qui se distinguaient à l'oeil nu de leurs parents par leur grandeur et qui appartenaient au type ordinaire du *L. delbrücki.* Ces colonies furent ensuite ensemencées dans du moût en matras à fond plat et gardées à 37°. Après trois jours l'acidité était environ de 3 cM³ par 100 cM³ de moût, ce qui démontre la réalité de la transformation. Quand ces mêmes colonies sont ensemencées dans le même moût en bouteille close, la croissance et la fermentation sont le troisième jour bien plus intensives, l'acidité est de 9 cM³ et il y a une forte production d'acide carbonique. On voit donc que par la culture à l'air au-dessus de l'optimum le *L. fermentum* s'est vraiment transformé en *L. delbrücki,* car les caractères principaux de la première forme: la manque presque totale de croissance sur gélose à l'air et de production d'acide jusqu'à 15 cM³. dans le moût aéré à la température optimum, ont été remplacés par la force végétative beaucoup plus grande et la force fermentative beaucoup plus petite du *L. delbrücki.* Le *L. delbrücki* ainsi artificiellement produit se laisse cultiver pendant des mois sur le gélose à moût sans perdre ses caractères principaux décrits § 5. C'est-à-

---

[1]) Die Säuerung des Hefegutes. Zeitschr. für Spiritusindustrie. 1881, pag. 1.

[2]) Ueber Milchsäuregärung. Wochenschrift f. Brauerei. 1887 N. 17.

dire, la forme artificielle est aussi constante que celle isolée des levains, et on ne saurait douter que dans les derniers il prenne de même son origine du *L. fermentum*.

Je me suis demandé si dans l'expériment décrit chaque individu du *L. fermentum* s'était transformé ou s'il y avait encore des individus non changés. Il est vrai qu' à l'oeil nu et à la loupe des colonies du *L. fermentum* étaient totalement invisibles. Mais il me semblait possible qu'elles pussent échapper complétement à l'attention par leur petitesse en cas que par mon expériment leur force végétative eût éte diminuée. Pour résoudre la question je coupai d'une plaque de moût à gélose, au moyen d'une spatule de platine, de petits morceaux sans colonies visibles situés entre les colonies du *L. delbrücki,* et j'inoculai ces morceaux dans du moût. Pourtant je pris la précaution d'employer du moût peu aéré dans des éprouvettes à boule, décrites auparavant. Après 24 heures déjà j'obtins de belles cultures de *L. fermentum* qui donc avait perdu le pouvoir de croître à l'air sur le gélose, mais croît et fermente encore très bien comme anaérobe dans le moût liquide.

Ce résultat un peu surprenant a été corroboré par la répétition de l'expériment et en outre par la culture directe sans air du *L. fermentum* à 48° C. A cette fin j'inoculai le 29 Juin une jeune culture normale de cette bactérie dans une bouteille bien close contenant du moût stérilisé très peu aéré et gardé à l'étuve à 48° C. Après trois jours, le 2 Juillet, l'acidité n'était que 5 cM³., c. à. d. encore moindre que dans la culture à air, et il ne se dégageait pas de gaz carbonique. Une goutte du contenu de la petite bouteille fut ensemencée sur moût à gélose à 37° C. Après 24 heures il ne s'était développée aucune colonie ce qui ne se changeait pas les jours suivants; il était donc clair que le *L. fermentum,* cultivé sans air à 48° C. peut déjà perdre dans 24 heures la faculté de croître à l'air sur la plaque. Pourtant les bactéries n'étaient pas du tout mortes, car un morceau de cette plaque, tiré de la localité où la goutte de la fermentation avait été dépossée et qui ne portait point de colonies, ensemencé dans du moût non aéré, donnait à 37° C. une belle fermentation et une acidité de 9 cM³. en trois jours. La même plaque ayant été conservée encore deux jours de plus, montrait quelques belles colonies du *L. delbrücki.* J'en avais attendu le développement en petit nombre, parceque que l'aération, bien que minime, n'avait pas totalement manqué dans la bouteille close. Il s'ensuit que l'expériment avec la bouteille et celui avec le matras donnent qualitativement le même résultat, tandisque la quantité des *L. delbrücki* produite à l'air est beaucoup plus grande qu'à exclusion *presque* compléte de l'air.

Quand nous considérons les phénomènes de cette transformation de plus près, nous voyons qu'elle consiste en deux métamorphes apparemment indépendantes: la formation du *L. delbrücki* dont la force végétative à l'air sur la plaque est plus grande que celle de la souche, et la production d'une race anaérobie qui a totalement perdu le pouvoir de croître sur les plaques à l'air. Il n'y a pas de raison suffisante de conclure que ces deux races antagonistes soient le produit d'une seule et même partition cellulaire hétérogène du *L. fermentum,* celui-ci se décomposant, pour ainsi dire comme un hybride, en deux éléments qui, s'il était possible de les combiner de nouveau, reproduiraient la forme souche. Cependant il n'est pas impossible que les faits soient réellement d'accord avec cette conception.

Pour l'industrie la transformation du *L. fermentum* en *L. delbrücki* est de première importance, vu que le *L. fermentum* est un microbe d'une activité extraordinaire

qui se nourrit de corps azotés destinés pour la levûre, et qui peut produire de l'acide, même à la température de la fermentation alcoolique. Le *L. delbrücki* au contraire, est complétement inactif sous les conditions de cette fermentation.

8. *Transformation du Lactobacillus delbrücki en L. fermentum.*

Tandisque pour la transformation du *L. fermentum* en *L. delbrücki* nous avons fait usage d'une culture à l'air au-dessus de la température optimum, c'est par l'anaérobiose à température ordinaire que la transformation inverse s'accomplit. On aboutit le plus vîte à ce résultat en cultivant dans une bouteille tout à fait remplie de moût et bien fermée. A l'air le développement du *L. delbrücki* en moût est insignifiant et l'acidité reste très basse, par exemple dans le tableau pag. 188 de 1 à 3,5, ce qui ne change guère par des transports successifs, mais à l'exclusion de l'air les acidités deviennent plus grandes dès le premier transport. Si l'on répète les transports de bouteille fermée en bouteille fermée, on observe déjà au 4me ou au 5me transport en 10 ou 12 jours, un complet retour au maximum d'acide de 17 cM^3, qui peut être produit dans 100 cM^3 du moût choisi.

Suivant au microscope les changements morphologiques parallèles à la croissance des acidités dans les inoculations successives, ou ne voit absolument rien, sinon une plus grande opacité des bacilles de plus en plus anaérobies. Mais quand on fait des semences sur moût à gélose la différence devient bien autrement claire, car alors on trouve déjà dés la première culture sans air des colonies qui se laissent difficilement distinguer des vrais *L. fermentum,* quoique dans le moût aéré elles ne donnent pas l'acidité maximum. Par des transports anaérobies subséquents, les semences sur le substatum solide produisent le *L. fermentum* en toute perfection, croissant en petites colonies transparentes sur l'agar à moût et composées de courts bacilles, très irréguliers quant à la largeur et la longueur.

La question ce que deviendrait notre ferment après une beaucoup plus longue série de transports anaërobies n'a pas encore été entièrement traitée, mais je m'occupe d'expériments pour en trouver la réponse définitive.

Conclusion.

Du point de vue théorique il est à remarquer que les transformations décrites donnent le premier exemple de variation expérimentale progressive et rétrogressive à volonté. La rapidité avec laquelle elles peuvent être induites et l'exactitude que le titrage de l'acide apporte dans leur étude en font un véritable expériment de laboratoire. De plus, le pouvoir fermentatif extraordinaire de la forme type du microbe du levain, son double action sur le lévulose dont il transforme la partie non acidifiée en mannite avec une rapidité remarquable, enfin, l'impossibilité de croître au-dessous de 25° C., sont des caractères qui méritent l'attention.

Je ne crois pas que pour l'industrie de la levûre viennoise, dans sa phase de développement actuelle, les cultures pures du *L. fermentum* soient de signification, le procédé du levain lactique en pâte étant très perfectionné et répondant aux exigences des praticiens. Au contraire, leur introduction dans le levain liquide de l'industrie de la levûre à air, serait sans doute un progrès décisif. Mais seulement une bonne

méthode et une connaissance suffisante de la biologie du ferment pourraient rendre des services réels. Les conditions essentielles pour la réussite pratique seraient: *En premier lieu,* la culture du ferment dans le travail du levain au-dessus de son optimum de 41° C., ce qui transforme le *L. fermentum,* actif même aux températures de la fermentation alcoolique, c. à. d. entre 26° et 30° C., dans le *L. delbrücki,* temporairement inactifs à ces températures au double point de vue de l'acidification et de la croissance. *En second lieu,* de poursuivre une culture souche du ferment à 40° C., franchement aérée pour le renouvellement continuel du levain.

Si dans l'avenir l'acide lactique trouve un emploi plus étendu qu' à présent, sans doute les cultures du *L. fermentum* seront appliquées sur une grande échelle. Moi-même j'ai préparé à la fabrique néerlandaise de levûre et d'alcool à Delft quelques centaines de kilogrammes de cet acide pour remplacer les ferments eux-mêmes dans la fabrication de la levûre, me basant sur la méthode du levain lactique à carbonate de chaux et décomposant le lactate de chaux par l'acide oxalique. Mais j'ai rencontré de si grands obstacles par diverses infections, surtout par les variétés mucipares du *Lactobacillus caucasicus,* que si l'acide s'était montré vraiment utile j'aurais certainement tâché d'introduire les cultures pures du *L. fermentum* dans mon procédé.

Expériences relatives à l'accumulation des bactéries de l'urée. Décomposition de l'urée par l'uréase et par catabolisme.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome VII, 1902, p. 28—63. — Verscheen onder den titel »Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, VII. Band, 1901, S. 33—61.

Dans la phase actuelle du développement de la microbiologie, que l'on pourrait appeler »la phase systématique«, parce que, comme dans toute science en voie de formation, on s'y occupe de reconnaitre et de classer les matériaux fournis par la nature, les expériences relatives à l'accumulation des microbes ont une importance toute particulière. Elles ont pour but d'isoler et de développer d'un mélange d'organismes les plus divers les espèces et variétés adaptées à certaines conditions vitales, déterminées d'avance. Il se forme ainsi des amas semblables à ceux que la nature présente en quelque sorte d'elle-même, soit dans les fermentations naturelles, soit dans les maladies microbiennes, dont l'étude a servi de base au développement de la bactériologie moderne. Mais dans l'accumulation scientifique on exclut tout ce qu'il y a de fortuit dans l'accumulation naturelle, pour le remplacer par des facteurs déterminés [1]).

Une propriété remarquable, commune aux accumulations scientifiques et naturelles, consiste en ce que les amas qui en résultent ne sont pas constitués par une variété unique de microbes, comme cela est toujours le cas quand on part d'une colonie pour faire de nouvelles cultures, mais ils se composent de toutes les variétés que l'on rencontre dans la matière employée pour infecter, et qui peuvent se développer dans les conditions choisies. De cette manière nous apprenons à connaître les espèces non seulement dans quelques variétés spéciales, mais encore au point de vue de leur variabilité, ce qui est de toute importance pour la diagnose. Cette importance est même telle, que l'on peut prétendre que toute détermination microbienne doit s'appuyer sur une expérience d'accumulation.

Nos connaissances des conditions vitales de la plupart des microbes sont cependant si imparfaites que, dans beaucoup de ces épreuves, nous n'arrivons jusqu'ici qu'à une augmentation relative de la forme désirée, sans que les autres

---

[1]) Les »expériences d'accumulation« ne sont pas seulement importantes au point de vue scientifique, mais encore au point de vue pédagogique. Je me propose de publier plus tard un aperçu de toutes les expériences de cette sorte qui se pratiquent dans mon laboratoire aux exercices de bactériologie.

espèces disparaissent complètement de la culture, et même cette augmentation ne s'observe-t-elle souvent qu'à un moment déterminé de l'expérience, tandis qu'à des époques antérieures ou postérieures ce sont d'autres formes qui prédominent. Il résulte de là que nous pouvons diviser les expériences d'accumulation en »parfaites« et »imparfaites«; les premières conduisent à une espèce unique, avec toutes les variétés qui y appartiennent. On ne connaît jusqu'ici qu'un petit nombre de pareilles »expériences parfaites d'accumulation«, mais il est certain qu'elles augmenteront à mesure que nos connaissances s'étendent, car il s'agit d'une question touchant au cœur même de la bactériologie. Et il est à espérer que cela sera bientôt généralement reconnu, car le champ des investigations est étendu.

Dans les pages suivantes je me propose de décrire une pareille expérience d'accumulation parfaite, basée sur l'emploi de l'urée. J'y rattacherai quelques observations relatives à la flore de l'urée en général, ainsi qu'a la biochimie de la décomposition de l'urée.

Dans ces recherches j'ai été secondé avec beaucoup de zèle par M. A. van Delden, qui s'est chargé en même temps de faire les photographies.

1. *Historique.*

Bien que la présence d'urée dans les substances nourricières les plus différentes occasionne avec beaucoup de facilité l'accumulation de certaines bactéries décomposant l'urée, personne jusqu'ici n'a essayé d'y baser une expérience d'accumulation scientifique. Une connaissance superficielle de la littérature pourrait cependant faire croire le contraire, puisque M. van Tieghem un des premiers investigateurs de la flore de l'urée, en a certainement et avec intention poursuivi l'accumulation[1]). C'est ainsi qu'il a exposé à l'air libre, dans des bocaux ouverts, de l'urine ou un liquide nourricier (de l'eau de levûre à 2,5 %) contenant $1\,^1/_3$ % d'urée, où, par l'infection spontanée par des germes atmosphériques il observa, parmi d'autres formes de décomposition, dans quelques cas l'hydratation de l'urée avec formation de carbonate d'ammoniaque. Il inocula le ferment de ces derniers bocaux dans d'autres remplis du même liquide nourricier encore intact, et il y observa alors des phénomènes de décomposition encore plus intenses. Il prétend que dans ces conditions il obtenait exclusivement des cultures d'urocoques, en quel cas son expérience serait en effet une expérience d'accumulation parfaite. Mais, quand j'ai repris les épreuves de M. van Tieghem, exactement d'après ses propres préceptes, ou, dans d'autres cas, en recourant aux matériaux où naissent et se developpent les germes qui se rencontrent dans l'atmosphère, c. à. d. en infectant directement avec la poussière du sol, ou même avec de l'urine en voie de décomposition, pour éviter ainsi ce qu'il y a de trop fortuit dans une infection par l'air, je n'ai jamais obtenu le résultat décrit par lui. Il est vrai que dans ces expériences j'observais régulièrement une décomposition de l'urée, mais, à côté de plusieurs saprophytes inactifs, je reconnaissais la présence de plusieurs

---

[1]) Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique. Thèse no. 256, Paris 1864, pp. 26, 29. L'acide hippurique ne se décompose pas par l'uréase, mais bien sous l'action de certaines bactéries.

bactéries bacillaires de l'urée; tandis que les urocoques n'étaient présents qu'en quantité si minime, que je n'ai pas pu les découvrir. Comment M. van Tieghem n'a trouvé dans ses cultures que des chaînes de microcoques, dont il donne des reproductions, voilà ce que je ne puis comprendre. La condition essentielle de l'accumulation scientifique de l'*Urococcus ureae* Cohn, dont il s'agit ici, notamment l'emploi convenable d'une basse température, lui était inconnue.

Voilà d'ailleurs pourquoi M. Miquel, le monographe des bactéries de l'urée, qui connaissait très bien le travail de M. van Tieghem, n'a pas jugé nécessaire de suivre sa méthode.

Cependant M. Miquel, malgré une étude de plusieurs années des bactéries de l'urée, n'a pas compris la haute importance des expériences d'accumulation, et il est remarquable que pour isoler les bactéries il ne reconnaisse même pas la moindre utilité aux accumulations naturelles. Dans l'édition complète de ses travaux sur ce sujet [1]) on peut lire p. ex. : „D'abord, où doit on rechercher ces ferments ? Il peut paraître rationnel et d'une bonne pratique d'aller à leur rencontre, soit dans les urines déjà fermentées, soit dans les liquides des vidanges; en un mot, dans les endroits où leur existence est facilement décelée par l'odeur. Cependant cette façon d'opérer me paraît défectueuse; si les urines fermentées peuvent présenter un ou plusieurs microbes, agents de l'hydratation énergique de l'urée, ces microbes y sont pourtant peu variés .... Je préfère, pour ma part, attendre que les ferments de l'urée se présentent spontanément à moi, soit dans le cours des analyses microscopiques des eaux, soit dans les analyses bactériologiques de l'air et du sol.« Et à la page 17 du même livre: »J'ai déjà dit qu'il était préférable de rechercher les ferments ammoniacaux parmi les organismes vulgaires de l'air, du sol et des eaux, présentés par le hasard à l'observateur, plutôt que de tenter de les isoler des urines ou des matières de vidange en fermentation.«

Pour reconnaître les microbes de l'urée, il introduit les colonies à étudier dans de la gélatine de bouillon de viande avec 2 % d'urée, où les bactéries qui décomposent l'urée forment du carbonate de calcium, se reconnaissant comme une poudre cristalline blanche à l'intérieur des colonies ou dans leur voisinage, phénomène que ne présentent pas les espèces ordinaires. Sur une pareille substance nourricière il apporte maintenant, si je comprends bien, tous les microbes possibles, jusqu'à ce qu'il rencontre dans le nombre une bactérie de l'urée, se qui est évidemment un procédé extraordinairement long.

Pour défendre cette méthode, M. Miquel rappelle la difficulté qu'il y a à isoler des liquides en question les formes qui agissent faiblement sur l'urée, puisque ces formes sont complètement refoulées par les autres plus fortes, tandis qu'il reste un grand nombre d'espèces inactives qui compliquent l'isolement des bactéries de l'urée proprement dites.

Dans mon expérience d'accumulation que je décrirai tout à l'heure, ces arguments sont complètement écartés, car au commencement se développent une série de formes faibles, puis viennent les formes fortes; d'autre part, dès le commencement de l'expérience, et par la présence de l'urée même, toutes les espèces in-

---

[1]) Etude sur la fermentation ammoniacale et les ferments de l'urée, p. 13, Paris, chez Carré et Naud, 1898. Reproduit des »Annales de Micrographie«.

actives sont arrêtées dans leur développement et finalement refoulés par la concurrence des bactéries décomposantes. Je ferai déjà dès maintenant remarquer que je dois ce résultat à l'observation, que la plupart des véritables bactéries décomposantes peuvent résister à une concentration en urée du liquide nourricier beaucoup plus élevée que celle qu'elles peuvent décomposer, et résistent aussi à une concentration beaucoup plus élevée en carbonate d'ammoniaque que celle qu'elles sont en état de produire; enfin, les espèces ordinaires, qui ne décomposent pas l'urée, du moins la plupart d'entre elles, sont plus sensibles aux hautes concentrations d'urée et de carbonate d'ammoniaque que les urobactéries elles-mêmes, ce que M. Miquel a pourtant décidément contesté.

Les autres auteurs qui se sont occupés de l'étude des bactéries de l'urée, tels que MM. von Jacksch, Leube et Scheridan Lea n'ont, pas plus que M. Miquel, fait des expériences d'accumulation de ces organismes.

On voit donc que des expériences d'accumulation de bactéries de l'urée, conduisant à des espèces déterminées, n'ont pas été décrites jusqu'à présent de telle façon qu'elles puissent être répétées avec succès.

2. *Généralités sur les expériences d'accumulation avec l'urée.*

Une étude systématique de ce sujet apprit que jamais les microbes ne décomposent l'urée, en présence des phosphates et des autres sels nourriciers nécessaires, si elle n'est pas accompagnée d'une source spéciale de carbone. Si on inocule par exemple, dans une solution aqueuse d'urée, contenant une quantité convenable de phosphate de potassium et de sels minéraux, les matériaux les plus divers contenant des bactéries de l'urée, ou ces bactéries en cultures pures, non seulement on n'observera pas de décomposition de l'urée, mais même pas le moindre développement de microbes.

L'addition d'une autre source de carbone quelconque, pourvu qu'elle n'appartienne pas aux substances aromatiques, en fait un liquide nourricier pour les bactéries qui décomposent l'urée [1]). Même l'acide oxalique, la source de carbone qui se prête le moins à la nourriture des microbes, ne fait pas exception à cette règle. C'est ainsi que dans une solution dont la composition était la suivante:

100	parties	d'eau
5	„	d'urée
1	„	d'oxalate d'ammonium
0,025	„	de KH^2PO^4,

et qui avait été infectée avec de la terre arable, je reconnus qu'un peu plus de 2% de l'urée étaient décomposés, lorsqu'elle était maintenue pendant 10 jours à 30° C. [2]).

---

[1]) Je dois faire à ce sujet une remarque importante: ce que je dis ici n'est vrai que quand il s'agit des premières inoculations faites avec les matériaux mentionnés. Le transport de cette première inoculation dans un liquide alimentaire identique ne provoque jamais l'hydratation de l'urée, sauf dans le cas où il y a des peptones dans ce liquide. Il ne semble pas exister d'exception à cette règle inattendue, sur laquelle j'espère revenir à une autre occasion.

[2]) Pour des considérations et des expériences relatives à la valeur nutritive d'une combinaison et à sa structure chimique, et dont la portée semble assez générale, voir F. J. Dupont et S. Hoogewerff, *Maandblad voor Natuurwetenschappen*, 1876, p. 1.

J'obtins le même résultat en remplaçant l'oxalate d'ammonium par 1% d'acétate de sodium, ce qui prouve que l'urée satisfait temporairement très bien au besoin d'azote de certains microbes de l'urée.

Quand l'oxalate d'ammonium fut remplacé par 1% de sel de seignette (tartrate double de potassium et de sodium), je reconnus encore que finalement 2% de l'urée étaient changés en carbonate d'ammonium. En prenant 1% de citrate d'ammonium la décomposition atteignait 3%, et enfin, avec du malate d'ammonium, 4% de l'urée primitivement présente étaint transformés. Dans chacun de ces cas on obtenait une ou deux formes d'urobactéries, qui paraissaient caractéristiques pour la source de carbone. Mais, comme il a été observé dans la note de la page précédente, ces microbes disparaissent des cultures par des transports successifs dans le même liquide.

On voit que dans aucune des solutions en question les 5% d'urée n'étaient complètement décomposés, et il existe certainement une relation entre la valeur nutritive de la source de carbone introduite et la quantité d'urée transformée.

Quand la quantité d'urée primitivement présente était inférieure à la quantité transformable, la décomposition était complète. Tel était le cas dans une solution de von Jacksch[1]) (dont 100 parties contiennent 0,025 de KH^2PO^4, 0,005 de $MgSO^4$, 0,5 de sel de seignette et 0,1 d'urée), et dans une autre contenant, sur 100 parties d'eau, 0,09 de KH^2PO^4, 0,2 de $CO^3(NH^4)^2$, 0,25 d'asparagine, 1 d'urée; toutes deux avaient été infectées avec de la terre arable et maintenues pendant 10 jours à 28° C. Mais dans ces cas aussi les transports dans le même liquide nourricier ne pouvaient être réitérés sans que la culture perdît totalement son pouvoir d'hydratation.

L'examen bactériologique de tous les liquides précédents a fait connaître que jamais on n'y trouve les espèces de bactéries qui, dans des conditions nutritives plus avantageuses, sont en état de transformer en carbonate d'ammonium des quantités d'urée beaucoup plus considérables, telles que l'*Urobacillus pasteurii* et l'*Urococcus ureae*. Mais quand je commençais par employer une meilleure solution nourricière, contenant à côté de l'urée des peptones, par exemple du bouillon de viande, la même infection ne transformait pas moins de 10 à 12% d'urée en peu de jours, et les transports successifs dans ce liquide alimentaire n'occasionnaient pas du tout la perte du pouvoir hydratant observée dans les cas déjà considérés, mais produisaient des cultures d'une force fermentative constante.

Ce résultat remarquable m'a engagé à soumettre cette dernière expérience à un examen approfondi. Cet examen apprit que toujours, à la fin de l'expérimentation, et même déjà après une couple de transports des cultures jeunes, on obtient une végétation pure de la plus active de toutes les bactéries de l'urée, notamment de l'*Urobacillus pasteurii* Miquel, tandis que dans les cultures jeunes se montrent passagèrement, mais avec une grande régularité, une série de bactéries moins actives. Il suit de là que toutes ces bactéries doivent être universellement répandues et très communes dans nos alentours, bien que jusqu'ici on ne leur ait accordé que peu d'attention, ou qu'elles soient restées complètement inconnues.

Mais avant de décrire cette expérience, je veux dire quelques mots de l'examen qualitatif et quantitatif de la décomposition de l'urée.

---

[1]) *Zeitschr. f. physiolog. Chem.*, 5, 395, 1881.

3. *Examen de la décomposition de l'urée. Phénomène de l'»irisation«.*

Pour poursuivre régulièrement la transformation de l'urée dans les liquides de culture, il suffit de déterminer la quantité de ce corps disparue par titrage du carbonate d'ammoniaque formé. D'après la formule $CH^4N^2O + 2H^2O = CO^3(NH^4)^2$, 60 g. d'urée donnent naissance à 90 g. de carbonate d'ammoniaque. Si ce carbonate est dissout, 2000 cm.³ d'acide normal sont nécessaires pour le neutraliser. Si donc 100 cm.³ d'un liquide nourricier à urée, primitivement neutre, exigent 100 cm.³ d'acide normal pour leur neutralisation, cela veut dire que 3 g. d'urée ont été transformés en 4,5 g. de carbonate d'ammoniaque; de sorte que la disparition de 1% d'urée correspond à 33,3 cm.³ d'acide normal. Pour le carbonate d'ammonium on peut admettre que 1 g. exige environ 22 cm³. d'acide normal pour sa neutralisation. Le sel du commerce se transforme pourtant à la longue, en donnant naissance à du carbonate acide (CO^3NH^5), du sesquicarbonate ($C^3O^9N^4H^{18}$) et du carbamate ($CO^2N^2H^6$). Par là l'alcalinité se modifie, de sorte que, du carbonate d'ammoniaque dont je me suis servi, 1 g. n'était pas neutralisé par 22 cm³. mais par 15 cm³. d'acide normal. On doit nécessairement tenir compte de cette circonstance et titrer ce soi disant »carbonate d'ammoniaque« avant de l'employer.

Bien que dans les expériences avec des bactéries de l'urée on perde toujours beaucoup de carbonate par évaporation des flacons bouchés à l'ouate, la précision des estimations n'est pas par là considérablement diminuée, puisque des dizaines, même des centaines de centimètres cubes d'acide normal sont nécessaires pour neutraliser 100 cm³. du liquide de culture. D'ailleurs, l'évaporation est d'autant plus faible que les solutions sont moins concentrées, de sorte que pour les urobactéries peu actives les erreurs sont beaucoup moins grandes que pour les formes très actives.

La réaction sur la présence ou l'absence d'urée dans du bouillon de viande s'effectue, au laboratoire bactériologique, d'une façon simple, basée sur l'emploi d'urobactéries ou d'uréase. Le liquide à analyser, — d'ordinaire un liquide nourricier contenant de l'urée en voie de décomposition et dont on veut déterminer s'il y a encore de l'urée non transformée, — est neutralisé à l'acide chlorhydrique s'il contient du carbonate d'ammonium, et, si la concentration du carbonate était élevée, dilué avec de l'eau pour abaisser la concentration du sel, qui pourrait retarder la décomposition ultérieure de l'urée. On y introduit ensuite une abondante quantité d'urobactéries (de préférence l'*Urobacillus pasteurii* ou l'*Urococcus ureae*), et on l'expose dans un bain d'eau à une température de 45—50° C. S'il reste encore de l'urée, il se forme au bout de 1 à 2 heures du carbonate que l'on peut titrer de nouveau.

Pour établir si certaines colonies de bactéries sont, oui ou non, en état de décomposer l'urée et, dans le premier cas, déterminer l'intensité approximative de cette décomposition, on arrive le plus rapidement au but en cultivant sur un milieu solide.

Nous avons dit plus haut qu'à cet effet M. Miquel se servait de bouillon de viande gélatinisé à 2% d'urée, où il reconnaissait les colonies décomposant l'urée par la formation de carbonate de calcium sous forme de poudre cristalline.

Toutefois, la sédimentation de ces cristaux ne commence qu'après plusieurs heures et ne s'effectue que très irrégulièrement; elle dépend des autres substances présentes dans la gélatine de culture, et de plusieurs conditions accessoires incomplètement connues. Il en résulte que cette méthode est de longue durée et incertaine.

Dans une décoction de levûre à gélatine, contenant 2 à 3% d'urée, j'ai trouvé un milieu beaucoup plus convenable pour arriver au but proposé, son emploi nous apprenant déjà au bout de quelques minutes si la décomposition de l'urée s'accomplit ou ne s'accomplit pas, et cela grâce à une réaction particulière, très curieuse, à laquelle je donne le nom de phénomène d'»irisation«.

Pour ces expériences il faut que l'eau de levûre soit concentrée et obtenue par décoction de 20 g. de levûre de boulanger dans 100 cm³. d'eau. Le liquide obtenu d'après les préceptes ordinaires (20 g. de levûre dans 1000 cm³. d'eau), avec la gélatine ordinaire du commerce, ne présente pas du tout le phénomène d'irisation [1]).

Si l'on prépare une plaque d'une gélatine contenant la bonne décoction de levûre à urée, et qu'on y dépose une particule de carbonate d'ammonium ou une colonie d'une bactérie décomposante, il se précipite non seulement du carbonate de calcium, mais encore, si je ne me trompe, du phosphate de calcium [2]). En tous cas, ce précipité a deux propriétés très remarquables: au commencement de l'épreuve il est absolument amorphe et se dépose exclusivement à la surface de la gélatine, en une couche tellement mince qu'on peut y voir de magnifiques anneaux de Newton. Cette couche »irisante« s'épaississant et s'élargissant graduellement, on observe un changement lent et régulier dans la coloration des anneaux, qui s'étalent en même temps. Après quelques heures se produit aussi dans la profondeur de la gélatine un dépôt blanc et amorphe, qui prend la forme d'une lentille plan-convexe; mais ce nouveau dépôt ne diminue en rien la beauté des couleurs de la surface. Cette surface colorée peut atteindre de grandes dimensions et couvre parfois des décimètres carrés de gélatine. La vitesse d'extension des anneaux dépend directement de l'intensité de la décomposition de l'urée, et permet d'évaluer l'activité des bactéries soumises à l'expérience.

Les bactéries non décomposantes sont sans action sur cette gélatine.

Il me serait impossible de donner en ce moment une explication chimique satisfaisante de ce phénomène d'irisation. Il est probable qu'il se forme une combinaison de phosphate et de carbonate de calcium avec une substance organique, une protéine peut-être, combinaison qui reste dissoute aussi longtemps qu'il existe de l'acide carbonique libre, mais qui se dépose en couche mince à la surface par suite de l'évaporation de cet acide. Je ferai encore remarquer que non seulement du carbonate d'ammonium, mais aussi du carbonate de sodium, déposé sur la plaque de gélatine, occasionne le phénomène de l'irisation; il n'en est pourtant pas ainsi du phosphate de sodium. D'autre part la gélatine à eau de levûre employée présente une réaction faiblement acide, de sorte que la mise en liberté d'acide carbonique pendant le phénomène ne semble pas improbable.

De ce qui précède résulte que la gélatine à levûre est aussi un indicateur convenable pour la recherche qualitative de l'urée au moyen d'uréase. A cet effet on opère de la manière suivante.

---

[1]) Dans quelques cas cependant j'ai rencontré dans le commerce des échantillons de gélatine qui présentaient le phénomène de l'irisation avec du carbonate d'ammonium déjà d'eux-mêmes, c. à d. dans les plaques obtenues par dissolution de cette gélatine dans l'eau pure. Dans de tels échantillons de gélatine, la substance qui produit le phénomène (probablement du phosphate et du carbonate de calcium en combinaison organique) doit être présente déjà dès la fabrication, tandis que d'ordinaire elle y fait défaut et doit être extraite de la levûre.

[2]) Probablement précédé d'une formation de carbamate ($CaC^2O^4N^2H^4$).

On commence par évaporer quelque peu la gélatine à eau de levûre, et on l'étend ensuite avec une quantité du liquide, où l'on se propose de déterminer la présence ou l'absence de l'urée, à peu près égale à la quantité d'eau disparue. On en coule alors une plaque qu'on laisse se solidifier. Si l'on y apporte maintenant en quelque endroit de l'enzyme uréase, ou quelque culture de bactéries à uréase, comme l'*Urobacillus pasteurii* ou les urocoques ordinaires (*Urococcus ureae* Cohn)[1]), on observe au bout de quelques minutes le phénomène de l'irisation tout autour de l'uréase ou des bactéries, à condition qu'il y ait de l'urée en présence. En dehors de cette substance je ne connais aucun autre corps qui produise dans ces conditions le phénomène de l'irisation.

On peut arriver au même résultat en renversant l'épreuve, c. à. d. en introduisant dans la gélatine à décoction de levûre, non de l'urée, mais une grande quantité d'uréase ou de bactéries de l'urée. Si l'on coule une plaque de cette gélatine, on y produira le phénomène de l'irisation en y déposant une goutte d'une solution d'urée ou d'une culture qui en contient. Il va de soi que de cette manière il n'est pas aussi aisé d'examiner une quantité considérable d'une solution pauvre en urée que d'après la première méthode, mais la plaque à uréase permet de comparer facilement un grand nombre de flacons d'épreuve, en admettant toutefois que la teneur en urée ne soit pas trop faible. Des estimations quantitatives sont possibles par les deux méthodes.

4. *Accumulation de l'Urobacillus pasteurii* Miquel.

Je passe maintenant à la description de l'expérience qui m'a conduit au résultat bien net que j'ai communiqué à la fin du § 2. Elle est très simple: à du bouillon de viande, obtenu comme d'ordinaire, on ajoute 10% d'urée et on fait bouillir, ce qui rend la solution légèrement alcaline. On infecte ensuite ce bouillon avec de la terre fraîche ou pasteurisée au préalable[2]) et on cultive à 23—30° C. Cette expérience a jusqu'ici conduit dans tous les cas, sans exception, après un nombre variable de jours, à une culture d'*Urobacillus pasteurii,* accompagnée au commencement de plusieurs autres espèces de bactéries de l'urée, mais restant finalement à l'état de culture pure.

Dans cette expérience la décomposition de l'urée est assez uniforme et finit toujours par être complète. Il en est encore ainsi quand on introduit 11 à 13% d'urée au lieu de 10%. Si la teneur en urée est plus haute une partie reste indécomposée, et pour une teneur de 20% il ne se transforme plus que 4% en carbonate.

Des nombreuses épreuves je citerai une seule, pour bien faire voir l'allure de la décomposition de l'urée. A la température de l'optimum, ± 30° C., la vitesse de transformation est très grande; c'est pourquoi j'ai fait les cultures à 23° C., afin de réduire cette vitesse. Ici comme toujours la proportion de carbonate d'ammonium a été exprimée en centimètres cubes d'acide normal, nécessaires pour la neutralisation de 100 cm^3. du liquide de culture. Voici les titres trouvés:

---

[1]) Ce dernier est très facile à employer dans les laboratoires, parce qu'il se développe parfaitement sur la gélatine de viande ordinaire en se remplissant d'uréase.

[2]) La pasteurisation est sans effet sur le résultat final, mais modifie complètement la »préflore« (p. 89).

12 avril: infection avec de la terre fraiche, titre primitif 0,5 cm.^{3}
19 „ titre 32
23 „ „ 106
24 „ „ 280

L'urée a maintenant complètement disparu et il ne s'est amassé pas moins de 13,44% de carbonate d'ammoniaque. Puisque 10% d'urée correspondent à 333 cm^3., $1^2/_3$% d'urée ont disparu par évaporation de 2,5% de carbonate d'ammoniaque, de sorte qu'il s'est formé en tout 16% de carbonate. Malgré cette perte considérable, l'expérience ne doit pas être considérée comme peu précise. Il serait d'ailleurs facile, si on le jugeait désirable, d'atteindre une précision plus grande, mais pour notre but cela était parfaitement inutile. Une fois que la décomposition est en train, on peut, comme nous venons de dire, augmenter considérablement la vitesse de transformation en élevant la température jusqu'à 30^0 C., donc diminuer de beaucoup la durée de l'expérience.

A la fin de l'épreuve le liquide ne contient plus qu'un petit nombre de bactéries, de très minces bâtonnets, parmi lesquels quelques spores rondes isolées. La grande majorité des spores, comme d'ailleurs presque tous les individus vivaces et capables de se développer et reconnaissables sans difficulté au microscope, appartiennent à l'espèce *Urobacillus pasteurii*, tandis que les nombreuses autres espèces, qui à l'origine s'étaient développées parallèlement à la précédente, ont été refoulées dans le cours de l'expérience et sont mortes, à l'exception de leurs spores qui se laissent déceler par la méthode des plaques à gélatine de viande ordinaire, sur lesquelles l'*U. pasteurii* ne se développe pas du tout.

L'expérience conserve, comme je l'ai dit, le même caractère si on élève à 13% la teneur en urée. Le titrage donne alors jusqu'à 340 cm^3. d'acide normal pour 100 cm^3. de solution, ce qui correspond à la transformation de 11,2% d'urée en 16,34% de carbonate d'ammoniaque. Comme dans ce cas encore la transformation de l'urée est complète, il a dû s'évaporer 4,46% de carbonate, correspondant à 93 cm^3. d'acide normal. S'il n'y avait pas eu de perte de carbonate d'ammonium, l'alcalinité aurait été de 433 au lieu de 340.

Comme on pouvait s'y attendre, en égard à la quantité très variable de germes d'urobactéries qui se développent au commencement, dans de pareilles infections grossières, l'instant où l'on commence à s'apercevoir de la décomposition de l'urée est lui-même très variable. C'est ainsi que dans des expériences faites à environ 28^0 C., la transformation commençait:

après 2 jours, dans 3 expériences
„ 4 „ „ 1 expérience
„ 5 „ „ 1 „

Dans toutes ces expériences et dans beaucoup d'autres, toujours avec 10% d'urée, la transformation, une fois commencée, s'achevait à peu près avec la même vitesse; le titre final était de 280 à 290 cm^3. d'acide normal, ce qui correspond à $8^1/_3$% d'urée présente encore sous forme de carbonate d'ammoniaque, et à $1^2/_3$% d'urée disparue par évaporation du carbonate. L'égalité de la durée de la transformation s'explique par le fait que dans les dernières phases c'est toujours, comme nous l'avons vu, la même bactérie, *U. pasteurii*, qui effectue le travail principal.

Ainsi que je l'ai déjà dit, notre expérimentation peut encore se faire avec de la terre pasteurisée, parce que les spores d'*U. pasteurii,* comme d'ailleurs celles de plusieurs autres espèces d'urobactéries de la »préflore«, résistent quelque temps à une température de 95° C., et pendant longtemps à des températures de 80—90° C. En employant pour l'infection des matériaux pasteurisés, le commencement de la décomposition se fait toutefois plus longtemps attendre que si l'on se sert de terre fraîche, ce qui tient certainement à ce que les espèces qui ne forment pas de spores (comme *Urobacillus miquelii)* et les états végétatifs des espèces sporogènes, états que l'on rencontre dans le sol à côté des spores, ont été détruits, ce qui n'est pas sans influence sur l'*U. pasteurii,* qui exige un milieu alcalin pour son développement. Mais nous reviendrons tantôt sur cette différence.

Pour reconnaître et distinguer les urobactéries, M. Miquel les a classés en coques qu'il designe par le nom d'*Urococcus,* et en bacilles qu'il appelle *Urobacillus* [1]). Dans le genre physiologique *Urococcus* il classe 9, dans le genre *Urobacillus* 8 espèces, ce qui est assez pratique dans l'état insuffisant de nos connaissances actuelles des relations réelles. Pour un classement plus détaillé il se base sur l'intensité de la décomposition de l'urée et sur la quantité d'urée qui peut être décomposée en tout, ce qui rappelle la force fermentative et le degré d'atténuation chez les levûres alcooliques. Ici comme là on obtient ainsi des nombres très utiles pour une diagnose définitive, et il est certain que dans beaucoup d'autres cas on pourra se servir avec avantage, pour le diagnostic des microbes, de pareilles propriétés susceptibles d'être mesurées et exprimées numériquement. Il me semble cependant que M. Miquel attache trop peu d'importance à la nature des sources d'azote et de carbone, capables d'être assimilées par les diverses urobactéries: ainsi que je l'ai déjà fait observer au § 1, ces sources peuvent même conduire à des espèces particulières d'urobactéries, par des expériences d'accumulation déterminées.

Ce serait aller trop loin que de décrire toutes les formes qui se présentent assez régulièrement dans mon expérience et dont le nombre est assez considérable. Je me contenterai d'en choisir quelques-unes particulièrement remarquables, tant par la régularité avec laquelle on les obtient que par leurs caractères physiologiques. En premier lieu j'ai à citer sous ce rapport l'*Urobacillus pasteurii* lui-même, dont l'activité extraordinaire dans la décomposition de l'urée laisse bien loin derrière elle celle de toutes les autres espèces, et qui attire spécialement l'attention, tant par sa présence inattendue dans toute poussière et toute terre, que par l'impossibilité de se laisser cultiver sur les plaques ordinaires. Je parlerai ensuite de 2 bacilles qui se rencontrent généralement l'un après l'autre au commencement de l'épreuve d'accumulation, mais sont plus tard refoulés des cultures par l'*U. pasteurii.* La première de ces deux espèces, qui ne forme pas de spores, est appelée ici *Urobacillus miquelii,* la suivante, sporogène, *U. leubei.* Enfin je décrirai une sarcine mobile, très intéressante, produisant des spores et par conséquent résistant à la pasteurisation des matériaux employés pour l'infection. Je lui donne le nom de *Planosarcina ureae* [2]). Une fois que j'eus

[1]) M. Miquel a aussi fondé un genre *Urosarcina* avec une seule espèce. Cette espèce appartient toutefois au genre *Bacillus.* Les véritables sarcines décomposant l'urée, dont je dirai quelques mots dans la suite, lui étaient inconnues.

[2]) Le genre *Planosarcina* a été introduit par M. Migula, System der Bakterien, II, 275, 1900. Je me rallie à sa délimitation.

découvert les spores de cette espèce, je pus démontrer aisément que certaines autres sarcines, parmi lesquelles des formes immobiles, sont également sporogènes. Une d'elles, décomposant aussi l'urée, sera considérée d'un peu plus près dans une note au § 8.

5. *Description de l'Urobacillus pasteurii* Miquel.

Cette espèce, la plus active des bactéries de l'urée, a été découverte par M. Miquel en 1889; il l'a décrite de telle façon qu'il est possible de la reconnaître aisément [1]). Mais malgré sa grande répartition et son importance indubitable elle est restée assez peu connue, parce qu'elle ne se développe pas sur les terrains de culture ordinaires. Sa croissance ne devient possible que par la présence de carbonate d'ammoniaque libre, et comme la teneur en cette substance peut devenir très élevée sans préjudice pour la bactérie, l'addition d'une quantité suffisante de ce corps à du bouillon de viande gélatinisé fournit un terrain de culture sur lequel se développe très bien la bactérie en question, comme d'ailleurs certaines autres urobactéries, mais où l'on ne rencontre que fort peu des saprophytes ordinaires. Si l'on ajoute encore de l'urée à la substance nourricière la proportion de carbonate, au lieu de diminuer par évaporation, augmente pendant l'expérience, ce qui permet d'arrêter dans leur croissance les microbes les moins actifs et de ne conserver que les *U. pasteurii* et *U. leubei* tout seuls. Ainsi, pour cultiver l'*U. pasteurii*, je me sers de gélatine de viande à 0,3% de carbonate d'ammonique et 2% d'urée, de sorte qu'au commencement 100 cm³. de la gélatine liquide sont titrés par environ 6 cm³. d'acide chlorhydrique normal.

L'ensemencement, sur ce terrain de culture, de gouttes prises d'un bouillon à urée employé pour notre expérience principale permet de déterminer exactement l'instant où l'*U. pasteurii* commence à s'accumuler. Ce moment coïncide avec le commencement de la décomposition de l'urée, décomposition qui n'est d'ailleurs pas mise en train par l'*U. pasteurii même*, mais par d'autres espèces. C'est pourtant un fait remarquable que le développement de l'*U. pasteurii* commence déjà lorsque la quantité de carbonate d'ammonium formée aux dépens de l'urée est encore si faible, qu'une gélatine de culture de même alcalinité n'en permettrait pas la croissance, notamment 0,5—1 cm³. pour 100 cm³. de solution. Cela tient probablement à la forte teneur en urée, teneur impossible dans la gélatine (ou l'agar) de culture, parce que 10% d'urée en empêchent la solidification à froid. C'est aussi pourquoi l'*U. pasteurii* peut très bien s'obtenir à l'état de culture pure dans le bouillon de viande à 10% d'urée, sans qu'il soit nécessaire d'y ajouter encore du carbonate d'ammoniaque, de sorte que la décomposition de l'urée doit alors être mise en train par cette bactérie même. Il semble donc que pour l'*U. pasteurii* l'urée puisse remplacer, au moins partiellement, le carbonate d'ammonium.

A l'origine les colonies d'*U. pasteurii*, qui se forment sur les solides de bouillon gélatinisé à urée et carbonate d'ammonium, ont l'apparence de plaques transparentes et vitreuses, et se distinguent de celles des autres espèces par la longue durée de leur croissance. Elles atteignent finalement un développement considérable, p. ex. 2 à 3 cm. de diamètre au bout de 2 à 3 semaines, sur des plaques nourricières suffisamment

---

[1]) Fermentation ammoniacale, p. 39.

étendues. D'ordinaire la gélatine se liquéfie au bout d'un certain temps, à commencer par le centre de la colonie, et de temps à autre on trouve des colonies qui liquéfient fortement dès le commencement et que l'on pourrait tenir pour une espèce particulière. Elles ne se distinguent toutefois des formes moins liquéfiantes que par leur richesse extraordinaire en spores, et par conséquent aussi en bactéries végétatives mortes, parce que les bâtonnets meurent à la suite de la formation des spores. Or, ce sont précisément ces restes qui occasionnent la liquéfaction [1]). Des inoculations répétées font perdre aux microbes leur pouvoir d'excessive sporulation, donc aussi leur pouvoir de liquéfier la gélatine. Cela provient de ce que l'on transporte toujours plus de bâtonnets végétatifs que de spores, à moins de prendre des précautions spéciales, et beaucoup de ces bâtonnets perdent complètement la propriété de former des spores. Si l'on a soin de pasteuriser la matière avant de l'inoculer, de manière à ne semer que des spores, la sporogènese et les autres caractères variables de la culture transportée restent beaucoup plus constants [2]).

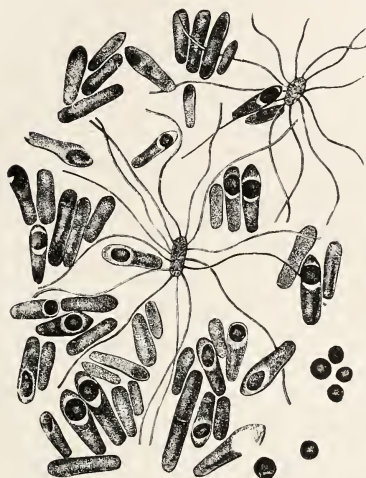


Fig. 1. *Urobacillus pasteurii* Miquel. Au centre et à droite en haut les cils ont été représentés avec la forme qu'ils ont probablement chez les bactéries vivantes. Le reste de la figure rend exactement les organismes vivants. A droite en bas on voit 6 spores sphériques isolées. Gross. 2580.

La longueur et l'épaisseur des bâtonnets varient considérablement avec le terrain de culture. Dans les cultures liquides de bouillon de viande à 10% d'urée, les microbes sont d'abord gros et mobiles, mais finissent par devenir longs, minces et immobiles. Sur du bouillon de viande à agar, à 2% d'urée et 0,3% de carbonate d'ammoniaque, ils sont assez longs (4 à 5 μ p. ex.), et leur grosseur peut atteindre 1,5 μ; en même temps on y reconnaît plusieurs formes semblables à un clostridium (fig. 1, et Pl. fig. 1 et 2). Aussi longtemps que la proportion de carbonate est faible, la mobilité est grande; les cils sont nombreux et couvrent la surface entière; ils peuvent dépasser les bâtonnets de 10 fois leur longueur.

---

[1]) Le même phénomène s'observe encore chez plusieurs autres bactéries sporogènes, ainsi que chez plusieurs levûres alcooliques, comme *Schizosaccharomyces octosporus*, dont on trouve de plus amples détails dans *Centralbl. f. Bakt. etc.* 2 Abth. Bd. III, 1897, p. 521. A mon avis cette liquéfaction est produite par une modification de la trypsine toujours présente, mais qui ne peut pas sortir par diffusion d'une cellule vivante, mais bien d'une cellule morte.

[2]) Dans mon laboratoire cette méthode est appliquée depuis des années; elle permet aussi de maintenir constantes plusieurs autres espèces de bactéries sporogènes. En 1898 déjà j'ai démontré ((*Centralbl. f. Bakt. etc.* 2 Abth. Bd. IV, p. 657) que de cette manière on peut empêcher même la variation des levûres. La règle a une portée considérable et s'applique aussi à d'autres divisions du système naturel.

Les spores sont parfaitement sphériques et mesurent environ 1 μ. Mais il y a aussi des spores beaucoup plus petites. Pendant quelques instants elles supportent l'ébullition, mais elles meurent par un chauffage prolongé non seulement à la température d'ébullition mais même à 90° C. Si l'on se propose donc de faire des expériences avec une terre qui doit contenir l'*U. pasteurii* vivant, on doit infecter avec de la terre fraîche, ou pasteurisée jusqu'à 80—90° C. au plus. Des cultures jeunes, sans spores, rappellent par leurs dimensions et leur mobilité les bacilles du foin.

De même que chez tant d'autres bacilles sporogènes, l'optimum de croissance est assez élevé, probablement 32° C. dans le bouillon de viande contenant peu d'urée. Le maximum est un peu au-dessous de 45° C. et le minimum est toujours plus élevé que 6° C.; dans les conditions ordinaires de culture il est même au-dessus de 10° C.[1]).

Puisque l'optimum d'activité de l'uréase est peu éloigné de 50° C., et est donc notablement plus élevé que l'optimum de croissance, M. Miquel observe: »Quand on voudra provoquer une prompte fermentation avec l'espèce qui nous occupe, on placera le liquide ensemencé vers 40° C. Si c'est un développement botanique qu'on désire surtout obtenir, on en exposera la culture à 30° C.« Il va de soi que tout dépend de la quantité des bactéries ensemencées.

Au sujet de l'intensité de la décomposition de l'urée, M. Miquel dit qu'à 30° C., et dans des conditions d'ailleurs avantageuses, *U. pasteurii* décompose par heure et par litre 3 g. d'urée au maximum. Dans mes expériences à 30° C., j'ai trouvé comme maximum de vitesse de décomposition 3,3 g. d'urée par heure et par litre; cette valeur plus élevée tient sans doute à ce que M. Miquel stérilisait toujours ses liquides de culture au-dessus de 100° C., tandis que je me contentais de les faire bouillir parce que la stérilisation est ici inutile; et l'on sait qu'une simple ébullition conserve mieux les propriétés nutritives des solutions que la stérilisation complète. Toutefois, pour atteindre ce résultat, la teneur en urée ne peut pas dépasser 12% (M. Miquel dit 13%), parce qu'une teneur plus forte diminue la vitesse de décomposition. Dans des solutions contenant 20% d'urée je n'arrivais qu'à décomposer 4% d'urée (correspondant à environ 120 cm³. d'acide normal pour 100 cm³. de solution). Cette décomposition était très lente; puis la décomposition s'arrêtait en même temps que le développement de l'*U. pasteurii.*

Si l'on ajoute au bouillon de viande 1—3% de glucose, la décomposition est au commencement plus active encore, mais plus tard cette vitesse diminue.

M. Miquel dit que, dans ses expériences, il s'est encore servi d' »urine artificielle«, composée de 100 p. d'eau, 2 p. de peptone Chapoteau, 0,005 de cendre de bois et 2—3% d'urée. En répétant les expériences avec cette solution je n'ai obtenu de bons résultats qu'en employant, comme M. Miquel, la peptone Chapoteau; avec la peptone sèche de Witte ou d'autres peptones du commerce je n'observai pas de croissance.

Je n'ai pas pu découvrir jusqu'ici, pour l'*U. pasteurii,* d'autres sources d'azote que celles contenues dans l'urine, le bouillon de viande ou la peptone Chapoteau; cette espèce est donc très délicate à ce point de vue. Même l'asparagine et le glucose, qui constituent une si excellente nourriture pour un grand nombre de bactéries, ne sont favorables ni à la croissance de l'*U. pasteurii,* ni à la décomposition de l'urée. Aussi les préceptes donnés au § 2 pour les expériences d'accumulation des microbes

---

[1]) Voir d'ailleurs les données de M. Miquel *(loc. cit.,* p. 62).

de l'urée en général ne s'appliquent-ils pas du tout à l'*U. pasteurii,* qui est donc, au point de vue de sa nourriture, une des bactéries les plus spécialisées qui existent.

Dans l'urine en voie de décomposition, cette espèce ne semble être présente que si pour l'une ou l'autre raison cette urine contient une fort proportion de matières organiques; on ne la rencontre pas dans l'urine diluée avec de l'eau, où se développent les micrococques ordinaires. De plus, comme nous venons de dire, la température doit être assez élevée pour que la culture de l'*U. pasteurii* soit possible.

6. *Examen de la »préflore«. Urobacillus miquelii n. sp.*

Nous avons déjà fait remarquer que notre expérience d'accumulation ne fournit pas exclusivement, comme »flore principale«, une culture pure d'*U. pasteurii;* elle conduit pendant les premières étapes à une »préflore« qui consiste en plusieurs autres urobactéries, de sorte que cette expérience fait connaître une »flore de l'urée« assez étendue. Jusqu'ici je n'ai pas encore eu l'occasion d'étudier cette flore dans tous ses détails; c'est pourquoi je me bornerai, comme je l'ai annoncé, à examiner de plus près trois des formes les plus caractéristiques, et je crois que quiconque reprend mes expériences reconnaîtra ces formes, qui présentent donc un intérêt général. Ainsi que je l'ai dit au § 4, je leur donnerai les mons d'*Urobacillus miquelii, Urobacillus leubei* et *Planosarcina ureae.* Je n'ai pu les identifier avec certitude avec aucune espèce décrite.

Tandis que l'*U. pasteurii* ne croît sur un substratum solide qu'en présence de carbonate d'ammoniaque, les bactéries de la préflore se laissent facilement cultiver sur de la gélatine de viande ordinaire, tant avec de l'urée ou du carbonate d'ammoniaque que sans ces matières.

Pour reconnaître ces espèces, l'examen de la culture s'effectue de cette façon: à certains moments de l'expérimentation, déterminés par le titre du carbonate d'ammonium, on trace sur la gélatine de viande ordinaire des traits inoculatoires, et parmi les colonies ainsi obtenues on détermine, à l'aide du phénomène de l'irisation sur la gélatine de levûre à urée, quelles colonies décomposent l'urée et quelles autres ne le font pas.

On observe alors deux choses: d'abord, que 10% d'urée en solution dans le bouillon ralentissent déjà considérablement ou arrêtent même la croissance et l'accumulation de la plupart des espèces non décomposantes, avant même que la décomposition de l'urée ait commencé, et en second lieu, qu'a mesure que la proportion de carbonate d'ammoniaque augmente ces espèces sont réellement refoulées par les urobactéries, si leur croissance n'est pas déjà arrêtée par la présence de l'urée même.

Cette action pour ainsi dire vénéneuse que l'urée exerce, dans ces conditions, sur les bactéries ordinaires est remarquable. Si l'on infecte p. ex. notre solution avec une quantité de terre si considérable que le nombre des microbes qui se développent sur de la gélatine de viande au moment de l'ensemencement soit très grand, et que plus tard on ensemence de nouveau mais avant que la décomposition de l'urée ait commencé, on trouve que les formes communes, comme *B. fluorescens liquefaciens* et *B. fluorescens non liquefaciens* disparaissent très tôt et totalement. Un peu plus tard disparaissent encore les *Streptothrix chromogena*[1]), les champignons du foin, les

[1]) A ma description antérieure relative à cette espèce (ces *Archives* (2), 3, 338, 1900), je puis encore ajouter qu'elle existe en grandes quantités dans le sol, à 2–4 cm.

Bacillus mycoides et *B. megatherium,* bref tous les organismes généralement répandus dans le sol.

Ces faits sont en contradiction flagrante avec la description de M. Miquel qui, en divers endroits de son livre, insiste sur la grande difficulté qu'il y a à séparer les urobactéries des formes ordinaires. Ces difficultés n'existent pas dans notre expérience, qui conduit comme on le voit tout au contraire à une séparation très complète et très rationelle.

Il est toutefois remarquable que des cultures d'urobactéries, même d'*U. pasteurii,* dans du bouillon de viande à 10% d'urée, incomplètement stérilisé par ébullition et contenant par conséquent des spores d'autres bactéries saprophytes, contiennent souvent et bien longtemps pendant les premières phase de l'expérimentation certaines formes non décomposantes, plus souvent même que l'on ne rencontre ces formes dans les accumulations commencées avec de la terre fraîche, où ces saprophytes ont pourtant certainement existé à l'origine. Il faut donc que la flore de l'urée, se développant dans le dernier cas, soit en état de refouler ces infections, tandis que les cultures plus ou moins pures sont moins énergiques à ce point de vue. C'est sans doute à cette circonstance que l'on doit attribuer les difficultés rencontrées par M. Miquel, car il dit lui-même qu'il opérait souvent avec de pareilles »cultures partiellement pures«, provenant des poussières atmosphériques et contenant communément outre l'urobactérie elle même, une seule espèce de saprophyte accidentellement présente sur la même particule de poussière.

En même temps que les diverses formes saprophytes disparaissent, la flore de l'urée se développe déjà lorsque la décomposition de l'urée ne le décèle encore qu'avec peine par titrage du carbonate d'ammonium. Dans le cas où l'on se sert pour l'infection de terre non pasteurisée, l'image que présentent les plaques de gélatine ordinaire à cette époque, aussi bien dans l'état préliminaire que quand la décomposition de l'urée vient de commencer, est très caractéristique: elles contiennent alors une culture presque parfaitement pure d'une bactérie décomposante, non encore décrite à ce que je crois, que je nommerai *Urobacillus miquelii* (Fig. 2, Pl. fig. 3).

Dans du bouillon de viande à 6% d'urée, cette espèce décompose en 8 jours environ 1½% d'urée (correspondant à environ 50 cm³. d'acide normal nécessaires pour neutraliser 100 cm³. du liquide de culture); elle appartient donc aux espèces peu actives, mais est néanmoins remarquable comme membre particulièrement caractéristique de la flore de l'urée et par son ubiquité. Dans mon expérience d'accumulation on peut l'observer dans toutes ses variétés, et celles-ci sont nombreuses.

Sur de la gélatine viande les colonies d'*U. miquelii* sont grandes, étalées et découpées plus ou moins profondément sur les bords; dans quelques formes même elles sont fortement ramifiées, ce qui les fait ressembler à des colonies de *B. zopfii* et *B.*

---

de profondeur; à des profondeurs moindres ou plus grandes elle semble beaucoup moins répandue. Elle ne décompose pas l'urée, mais dans plusieurs expériences d'accumulation dans l'urée j'ai trouvé une autre *Streptothrix* non pigmentaire mais active, quoique faiblement. C'est là le premier exemple d'uréolyse par un organisme n'appartenant pas aux bactéries. Un second exemple est le *Saccharomyces mycoderma,* dont j'ai reconnu tout récemment, au moyen du phénomène d'irisation, le faible pouvoir urolytique.

asteroïdes[1]). Le pouvoir liquéfiant est faible, bien que la liquéfaction s'observe tôt ou tard chez toutes les variétés, et cela avec d'autant plus d'intensité que les colonies se ramifient moins sur la gélatine. Dans ces colonies la liquéfaction commence au centre et progresse vers les bords; souvent un large bord, non liquéfié, entoure une petite dépression centrale. Seules les colonies fortement ramifiées, semblables à des colonies de *B. asteroïdes*, ne liquéfient presque pas du tout, même dans des colonies très vieilles. D'ordinaire les colonies ont une couleur blanche jaunâtre, mais quelques formes sont nettement rosées.



Fig. 2. *Urobacillus miquelii* n. sp. A gauche en haut deux individus montrent le groupement probable des cils. Gross. 2580.

Il ne se forme pas de spores, de sorte qu'on ne peut obtenir l'*U. miquelii* que dans des cultures infectées avec de la terre fraîche; une pasteurisation au-dessus de 80° C. les détruit à coup sûr[2]).

U. miquellii est une bactérie en forme de bâtonnet, à mouvements propres. Les cils ne sont pas très nombreux et sont groupés tout autour (péritriches). A un point de vue phylogénétique l'*U. miquelii* doit certainement être classé dans le groupe auquel appartiennent *B. zopfii* et *B. asteroïdes*[3]).

Frottées sur une plaque de gélatine à décoction de levûre et urée, les colonies d'*U. miquelii*[4]) produisent déja après quelques minutes des anneaux colorés dont la lente extension démontre la faible activité urolytique de cette espèce. Des cultures sur gélatine longtemps conservés et complètement liquéfiées n'agissent plus sur l'urée, bien que leur trypsine soit encore active et puisse encore liquéfier énergiquement la gélatine, ce qui prouve que l'uréase conservée s'altère beaucoup plus vite que la trypsine. Plusieurs autres influences provoquent d'ailleurs la disparition complète de cet enzyme peu résistant.

Dans la littérature je n'ai pas pu trouver de description s'appliquant bien à ce microbe, bien qu'il soit très probable que parmi les innombrables diagnoses de bactéries déjà existantes, plusieurs se rapportent à certaines formes de cette espèce extrêmement commune. Ces diagnoses ne pourront toutefois jamais être considérées

---

[1]) *B. asteroides* et *B. zopfii* ne décomposent toutefois pas l'urée.

[2]) Des 8 urobacilles que décrit M. Miquel, *l'U. schützenbergii* seul ne contient pas de spores, mais dans les autres caractères la description de cette espèce ne s'accorde pas avec *U. miquelii.* J'ai découvert d'ailleurs plusieurs autres urobacilles non sporogènes

[3]) L'habitat de ces deux dernières formes est également la terre, mais elles ont une tendance à s'accumuler dans une solution de gélatine abandonnée à la putréfaction.

[4]) Aucune autre espèce ne peut s'obtenir par culture aussi rapidement en grandes quantités pour faire des expériences avec l'uréase.

comme étant d'une autorité suffisante, puisqu'elles ne se basent sur aucune expérience d'après laquelle chacun pourrait cultiver les formes en question en partant de matériaux fournis par la nature.

7. *Urobacillus leubei n. sp. comme membre de la »préflore« de notre expérience.*

A la deuxième espèce active qui, dans notre expérimentation, attire particulièrement l'attention par son importance et sa généralité dans la préflore, j'ai donné le nom d'*Urobacillus leubei* (Fig. 3; Pl. fig. 4). Malgré les différences nombreuses et intéressantes qu'elle présente avec *Urobacillus pasteurii,* je la considère cependant comme voisine de cette espèce. Si l'on cultive *U. leubei* sur de la gélatine de viande à carbonate d'ammonium, préparée pour la culture de l'*U. pasteurii,* il se forme des colonies vitreuses, transparentes, bien difficiles à distinguer de la dernière espèce. Mais, si l'on inocule l'*U. leubei* sur de la gélatine de viande ordinaire, elle y croît très bien, tandis que nous savons que l'*U. pasteurii* ne se développe pas du tout sur ce terrain. De même que l'*U. miquelii,* l'*U. leubei* se rencontre déjà dans notre liquide de culture avant même qua la décomposition de l'urée soit devenue notable, et peut même y demeurer jusqu'au bout, ce qui provient de ce que l'espèce est sporogène et que ses spores peuvent résister aux fortes alcalinités produites par l'*U. pasteurii.* Le nombre des individus de *l'U. leubei* diminue cependant dès que le titre de l'alcali dépasse 150 cm³. d'acide normal par 100 cm³. de liquide nourricier, parce qu'à partir de ce degré d'alcalinité les états végétatifs succombent. D'ordinaire les bâtonnets sont épais de 1,5 μ, et longs de 3 à 5 μ, mais parfois bien plus longs. Sur de la gélatine à bouillon de viande sans carbonate d'ammonium et sans urée, où, comme nous l'avons vu, il se développe parfaitement, l'*U. leubei* donne naissance à deux espèces de colonies: les unes sont des amas gris-jaunâtre, troubles, assez minces, présentant des spores; les autres sont plus transparentes, vitreuses, sans spores, mais ressemblent d'ailleurs à la forme trouble. Sur ce terrain de culture les deux espèces de colonies sont petites, et ne dépassent guère 2 à 3 mm. en diamètre; elles forment une mince couche, dont le bord est un peu plus épais que le centre. Les végétations obtenues dans les tubes à culture produisent également des amas minces et transparents, mais elles se développent alors de part et d'autre du trait inoculatoire sous forme d'une couche vitreuse transparente qui reste toutefois très pauvre en bactéries. Sur



Fig. 3. *Urobacillus leubei* n. sp. Les spores sont oblongues. Les cils n'ont pas pu être exactement reproduits. Gross. 2580.

un terrain contenant du carbonate d'ammonium les colonies deviennent beaucoup plus grandes. Il ne se produit de liqéfaction dans aucun des deux cas, pas même dans les vieilles cultures sur gélatine contenant des bactéries mourantes. Les spores sont oblongues, et mesurent 0,8—1 μ. Plusieurs bâtonnets, portant des spores, sont quelque peu élargis à l'endroit où se trouve la spore, d'où résultent des formes semblables à un clostridium; mais cette formation de clostridium n'est pas très frappante et beaucoup de bâtonnets à spores restent minces. On observe des mouvements propres dus à des cils péritriches; mais, comme ces cils sont difficiles à colorer et que leur longueur n'est pas aisément mesurable, ils n'ont pas été reproduits sur la figure.

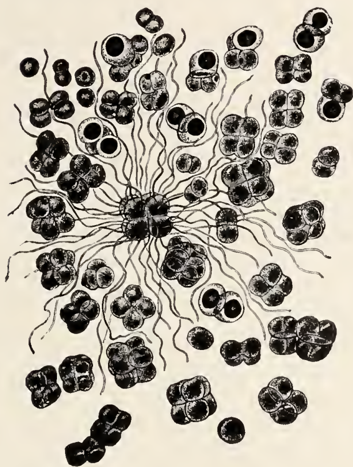


Fig. 4. *Planosarcina ureae* n. sp. Au centre un individu montrant la disposition probable des cils; ceux-ci sont environ 7 fois aussi longs que la bactérie elle-même; Les individus sporogènes ont presque totalement perdu leur contenu. Les spores sont sphériques Gross. 2580.

Les spores ont une grande résistance vitale et supportent même pendant quelque temps la température de l'eau bouillante. Dans un liquide de culture agité avec du chloroforme, les bâtonnets mouraient en moins d'une heure, mais les spores n'étaient pas même tuées au bout de 24 heures. Comme les spores supportent parfaitement l'exsiccation, on les rencontre aussi bien dans une terre desséchée que dans une terre fraîche.

Dans un bouillon de viande à 6% d'urée il se décompose environ, 2,5 d'urée en 4 à 5 jours, ce qui correspond à un titre d'alcali d'environ 80 cm³. par 100 cm³. de liquide. Ce nombre est la moyenne pour plusieurs expériences, qui donnèrent de 64 à 90 cm³. La raison pour laquelle la décomposition de l'urée s'arrête, alors qu'il reste encore un excès de cette substance et qu'il existe encore une masse des bactéries vivantes, reste ignorée ici comme dans plusieurs autres cas analogues, et ce fait est d'autant plus remarquable qu'ici, comme avec les *U. miquelii* et *U. pasteurii,* la décomposition a lieu sous l'action de l'uréase contenue dans les bactéries. Il faut donc que cet enzyme soit d'une activité très restreinte, et ne puisse décomposer qu'un petit nombre de fois son propre poids d'urée.

8. *La présence de Planosarcina ureae n. sp. et l'absence d'Urococcus ureae* Cohn *dans la »préflore«. Accumulation de cet urocoque.*

La *Planosarcina ureae* (Fig. 4, Pl. fig. 5 et 6) n'apparaît, dans notre expérience d'accumulation, ni avec la même régularité ni en aussi grand nombre que les deux espèces précédentes; elle appartient néanmoins aux urobactéries communes et, comme ses caractères morphologiques sont très intéressants, je veux m'y arrêter un instant.

C'est une espèce facile à cultiver sur de la gélatine de viande ordinaire, sur laquelle elle constitue des colonies plates, de consistance pâteuse, jaunâtres, d'assez grandes dimensions et non liquéfiantes; elles se reconnaissent immédiatement dans les semences sur plaques solides par leur grandeur et leur aspect. Les colonies aussi bien que les cultures liquides sont formées de groupes de 4 à 8 cellules, parfois davantage, très mobiles par des cils péritriches qui se détachent facilement quand on essaie de les colorer. Les cellules individuelles mesurent 0,7 à 1,2 μ et forment des spores sphériques de 0,6 μ de diamètre, supportant parfaitement la pasteurisation, de sorte que dans nos expériences d'accumulation cette *Sarcina* s'obtient tant par infection avec de la terre pasteurisée que par infection avec de la terre fraîche. On peut maintenir la température à 80° C. pendant 10 minutes sans préjudice pour les spores [1]). Les cils sont 7 à 8 fois aussi longs que les tétrades elles-mêmes.

Dans la chambre de verre que j'ai décrite antérieurement [2]), les cellules isolées et groupées, soumises à des expériences de respiration, viennent se rassembler, en vertu de leur mobilité, dans le ménisque sous le couvre-objet.

Cette espèce contient beaucoup d'uréase et, comme *U. pasteurii,* elle produit presque instantanément le phénomène de »l'irisation« sur la plaque de gélatine à levûre et urée.

Son activité à l'égard de l'urée n'est pourtant pas très forte; en 5 jours je n'ai pu obtenir qu'un titre de 90 cm³. pour 100 cm³. de liquide, ce qui correspond à peu près à 3% d'urée décomposée [3]). Les urocoques ordinaires, apparentées probablement à la *Planosarcina,* décomposent par contre 5% dans le même temps.

---

[1]) Les véritables sarcines, non mobiles produisent parfois aussi des spores rondes, très résistantes et supportant la pasteurisation. Par là il est possible d'extraire du sol une espèce commune, d'un faible pouvoir hydrolytique à l'égard de l'urée il est vrai, mais très intéressante à plus d'un point de vue, et qui ne se laisse cultiver que sur la gélatine à urine de cheval. Pour obtenir cette espèce, qui ne croît pas du tout sur la gélatine de bouillon de viande ordinaire, on chauffe pendant quelque temps de la terre arable dans l'eau à 80° C., et on la répand sur la gélatine à urine. En cultivant à 23° C., il se forme une culture de colonies toute particulière, contenant quelques espèces non encore décrites, très différentes des formes connues, et parmi elles notre nouvelle sarcine. Les colonies d'un blanc de neige, cassantes, apparaissent comme des disques assez solides, en forme de choux-fleur ou plus ou moins lamellaires, crépus et à bord élégamment découpé; elles ne produisent pas la liquéfaction de la plaque, d'où elles se détachent d'une seule pièce avec le fil de platine. Elles sont constituées par des paquets de sarcines dont les individus isolés mesurent ca. 1,5—2 μ, et d'un détritus de microcoques trop petits pour être mesurés; c'est pourquoi j'ai donné à cette espèce le nom d'*Urosarcina dimorpha.* Ces colonies décomposent l'indoxyl-sulfonate de potassium de l'urine en se colorant en bleu par l'indigo mis en liberté. Quelques autres espèces obtenues par cette expérience sont très curieuses, surtout au point de vue morphologique, parce que plusieurs d'entr'elles constituent des formes de transition entre les *Sarcina* et le *Bacillus megatherium,* et c'est par cette observation que j'ai reconnu pour la première fois la relation généalogique inattendue entre ces microbes en apparence si différents. Contrairement à ce que nous venons de voir pour *Urosarcina dimorpha,* ces formes intermédiaires croissent bien sur de la gélatine à bouillon de viande. Toutes supportent d'ailleurs la température de pasteurisation et on y trouve des espèces décomposant lurée.

[2]) *Centralbl. f. Bakt.* Bd. XIV, 1893. p. 827.

[3]) S'il n'y avait pas eu de perte de carbonate d'ammonium, 3% d'urée disparue aurait exactement correspondu à 100 cm³.

Dans notre expérience d'accumulation j'ai retrouvé cette espèce, même quand le titre était devenu 250 cm³.; quand la teneur en carbonate d'ammoniaque devenait encore plus élevée elle disparaissait.

D'ailleurs je ne l'ai pas seulement obtenue en cultivant dans du bouillon de viande à 10% d'urée, mais quelquefois aussi dans le liquide déjà mentionné au § 2: 100 parties d'eau, 0,025 de KH^2PO^4, 0,25 d'asparagine et 5 d'urée. Son besoin d'azote est donc différent de celui d'*U. pasteurii,* qui ne peut pas vivre de cette nourriture.

Parmi les habitants de la »préflore« et à côté des formes dont il vient d'être question on voit encore apparaître, assez régulièrement mais éphémèrement, dans notre expérience, quelques autres espèces d'urobactéries, parmi lesquelles des micro-coques jaunes ou incolores, plusieurs formes saprophytes, et enfin quelques bactéries en bâtonnets très particulières, mais non encore suffisamment étudiées jusqu'ici. Ainsi que je l'ai mentionné au § 6, note 1, j'y ai trouvé aussi, quoique sporadiquement, une *Streptothrix* agissant sur l'urée.

Il est à remarquer que je n'ai jamais rencontré, parmi la flore si variée de mes cultures, les microcoques très actifs de l'urine en putréfaction, que je désigne avec la plupart des auteurs sous le nom d'*Urococcus ureae* et que je considère comme identiques à ceux observés par Pasteur et M. van Tieghem, et appelés *Micrococcus ureae* par Cohn et Leube. M. Miquel subdivise cette espèce en plusieurs autres, mais à mesure que je me familiarisais davantage avec ces organismes, ses descriptions me devenaient de moins en moins compréhensibles. Voilà pourquoi je me tiens provisoirement à l'ancienne dénomination.

Je suis d'ailleurs parvenu, dans une expérience spéciale, à obtenir cette espèce, accompagnée de quelques-unes de ses variétés, à l'état de culture à peu près pure, en appliquant le principe que beaucoup de microbes non sporogènes, auxquels appartiennent les urocoques, sont »cryophiles«, c. à d. peuvent se développer à des températures plus basses que les bacilles sporogènes, qui sont pour la plupart »cryophobes« et même parfois »thermophiles«. Aussi voit-on se développer, dans l'extrait de levûre contenant 5% d'urée, infecté par les détritus micrococcifères d'un urinoir [1]) et maintenu pendant quelques jours à 11—13° C., de belles cultures de microcoques et de streptocoques. Mais je ne puis insister pour le moment sur les détails opératoires de cette épreuve.

9. *Physiologie de la décomposition de l'urée par l'uréase. L'uréase est intimement liée à l'organisme et absolument insoluble.*

On peut à présent considérer comme démontré que la décomposition de l'urée par les urobactéries ordinaires s'effectue sous l'action d'un enzyme, l'uréase. Pour s'en convaincre aisément je recommande l'expérience suivante. Une riche culture d'*Urococcus ureae* sur de la gélatine à bouillon de viande est transportée sur un verre porte-objet et placée sous une cloche à côté d'une cuvette contenant du chloroforme. Dans cette enceinte fermée, saturée de vapeur de chloroforme, les microcoques meurent bientôt, sans que leur uréase soit pour cela détruite. Si l'on transporte alors la matière

---

[1]) Il semble que dans le sol et la terre arable l'*Urococcus ureae* soit beaucoup plus rare que les urobacilles.

bactérielle morte sur une plaque de levûre à urée, cette plaque commence à iriser, au bout de quelques instants, presqu'aussi fortement que si l'on avait employé les mêmes microcoques vivants. L'action est cependant atténuée un peu, de sorte qu'une petite quantité d'uréase doit être rendue inactive par le chloroforme.

J'ai également précipité par l'alcool des cultures de l'*Urococcus* en question dans du bouillon de viande, et j'ai obtenu ainsi une préparation d'enzyme capable de décomposer l'urée, même après plusieurs années, bien que les bactéries y fussent certainement mortes et ne se développassent plus dans les meilleurs liquides de culture.

Si l'on veut faire ces expériences avec des bactéries sporogènes, en particulier avec l'*U. pasteurii,* on se heurte à des difficultés parce que le chloroforme ne tue pas les spores, qui germent rapidement pendant les expériences, ce qui fait que l'on opère de nouveau avec l'organisme vivant tout entier et non avec son uréase seule. On peut néanmoins se convaincre aisément du fait que les états végétatifs de ces espèces, obtenus p. ex. après deux jours de culture à 30° C. des spores d'*U. pasteurii* ou d'*U. leubei* sur du bouillon de viande à agar et à carbonate d'ammonium, et tués par l'action du chloroforme, décomposent aussi l'urée au moyen d'un enzyme.

Mais si l'existence de l'enzyme uréase est certainement établie, la question de savoir si cet enzyme est soluble ou insoluble dans l'eau est restée jusqu'ici controversée. M. Leube dit nettement que dans la filtration d'une culture d'urocoques par une bougie il ne passait pas la moindre trace d'enzyme[1]). Par contre, M. Miquel est tout aussi convaincu que dans les cultures l'uréase existe à l'état dissout. Il est d'avis que l'expérience de M. Leube a donné un mauvais résultat parce qu'il a opéré sur une quantité de liquide trop petite, ce qui a eu pour effet que toute l'uréase est restée dans les pores du filtre; et il ajoute que, si l'on presse à travers une bougie Chamberland plus d'un litre de liquide de culture, on finit par faire passer un liquide contenant de l'uréase.

D'après mon opinion, c'est M. Leube qui a raison, et nous devons attribuer les observations de M. Miquel à l'emploi de bougies défectueuses, présentant des fissures dans l'émail à endroit du raccordement; ces fissures laissaient passer peu à peu les bactéries. Les considérations et expériences suivantes me paraissent concluantes à ce sujet.

Dans le bouillon de viande, sans urée, l'*Urococcus ureae* se développe parfaitement et engendre beaucoup d'uréase. Or je crois que le raisonnement suivant est exact. Si l'uréase existe en solution, même colloïdale, et ne passe par la bougie qu'au bout d'une filtration plus ou moins longue, parce qu'elle est retenue dans les pores de la bougie,

---

[1]) Ueber die ammoniakalische Harngärung, *Virchow's Arch. f. patholog. Anat. u. Phys. u. f. klin. Med.*, 100, 540, 1885. A la page 569 M. Leube dit textuellement: »Es gelingt nicht ein ungeförmtes, harnstoffzerlegendes Ferment von den die Harnstoffspaltung bewirkenden Pilzen zu trennen.« Il dit pourtant plus qu'il n'a démontré, en affirmant dans la suite: »Und weiter glaube ich mich zu dem Schlusse berechtigt, dass die spezifische, freilich bis jetzt nicht näher definierte Lebensthätigkeit verschiedener in Reinkulturen gewinnbarer Pilze die Harnstoffzersetzung zustande bringt, nicht ein von denselben geliefertes ungeformtes Ferment, welches weiterhin, unabhängig von ihnen, Harnstoff in Kohlensäureammonium zu verwandeln vermöchte.« Nous verrons cependant que ces paroles de M. Leube, bien qu'inexactes pour les espèces qu'il a lui-même étudiées, s'appliquent néanmoins, sans qu'il ait pu s'en douter, à quelques bactéries lumineuses vivant dans la mer.

il faut qu'elle passe immédiatement par du papier à filtrer ordinaire, de structure si grossière qu'une partie des bactéries passe en même temps. Si donc dans un bouillon à urocoques l'uréase existe réellement à l'état de solution, il faut que ce bouillon, passé au filtre de papier, exerce sur une solution d'urée une action tout aussi forte que le liquide à bactéries non filtré, en opérant à une température mortelle pour les bactéries elles-mêmes, mais favorable pour l'action de l'enzyme, p. ex. à 50° C.

Par contre, si l'enzyme est fixé au corps de la bactérie elle-même et est insoluble, une solution filtrée ne peut agir qu'en raison du nombre des organismes qui ont passé par les pores du filtre; elle doit donc être beaucoup moins active qu'une solution non filtrée. Dans le dernier cas la matière restée sur le filtre, bien qu'en quantité excessivement petite, doit avoir une action particulièrement forte. L'expérience a prouvé que des deux éventualités possibles c'est la seconde qui est réalisée; l'uréase est donc absolument insoluble.

C'est ainsi que j'ai ajouté à une solution d'urée à 6% deux volumes égaux, l'un d'une culture fraîche d'urocoques dans du bouillon, l'autre de cette même culture filtrée. Dans une troisième épreuve j'ai introduit le filtre lui-même, avec la matière qui y était restée, dans le même volume de solution d'urée que dans les deux premières épreuves, et j'ai déterminé combien de cm^3. d'acide normal étaient nécessaires dans ces trois cas pour neutraliser 100 cm^3. du liquide. L'expérience à été faite à 50° C., température mortelle pour l'urocoque.

	Après 5 h.	Après 22 h.
1. Culture d'urocoques fraîche, non filtrée	50 cm^3.	72 cm^3.
2. Filtrat de la même culture	20 „	26 „
3. Filtre avec les bactéries	52 „	96 „

En comparant les résultats des épreuves 1 et 3 on reconnaît une concentration très notable de l'enzyme sur le filtre, bien que l'épreuve 2 prouve qu'un assez grand nombre de bactéries passent par les pores du filtre, qui n'arrêterait donc certainement pas une solution colloïdale. On doit conclure de là que l'enzyme n'est pas dissout, mais est fixé à la matière même de la bactérie; car si l'enzyme était en solution, même sous forme de très grandes molécules, on ne comprendrait pas pourquoi il se rassemblerait sur le filtre dont les pores laissent pourtant passer une partie des bactéries elles-mêmes, certainement des milliers de fois plus grandes que les molécules des colloïdes.

D'une façon peu claire et sans preuves suffisantes, M. Sheridan Lea[1]) a exprimé l'idée qu'après leur mort les urocoques perdraient leur enzyme par diffusion et ne le garderaient que pendant leur vie. L'expérience que je viens de décrire prouve clairement que cette opinion aussi est erronée, puisque j'ai opéré à la température de 50° C., mortelle pour les urocoques, ce qui aurait donné à un enzyme soluble l'occasion de quitter par diffusion, dans un temps très court, les restes extrêmement petits des bactéries, et de se dissoudre dans le liquide; on n'observe pourtant rien de cette dissolution.

---

[1]) Some notes on the isolation of a soluble urea-ferment from the *Torula ureae*. *Journ. of Physiology*, 11, 226, 1890.

Mais pour rendre le résultat plus décisif encore, j'ai comparé des cultures filtrées et non filtrées, tuées d'avance par une exposition de plusieurs heures à l'action du chloroforme. Les expériences ont d'ailleurs été organisées comme il a été dit plus haut. Le chloroforme est fortement préjudiciable non seulement aux bactéries mais encore à l'uréase elle-même, ainsi qu'on le reconnaît à l'épreuve III, où le filtre, avec les bactéries qu'il portrait, a retenu pendant toute la durée de la filtration du chloroforme à l'état pur, qui est ainsi resté en contact direct avec les bactéries, dont l'uréase devait donc avoir beaucoup souffert; dans les épreuves I et II ce n'était qu'en solution dans le liquide de culture que le chloroforme pouvait agir. Mais, malgré cette influence pernicieuse du chloroforme, l'expérience est néanmoins convaincante:

	Après 5 h.	Après 24 h.
I. Culture tuée par le chloroforme, non filtrée . .	14 cm³.	70 cm³.
II. Filtrat de la culture tuée par le chloroforme .	3 „	4 „
III. Filtre avec bactéries, traité par le chloroforme en liquide pur	8 „	28 „

Malgré le peu de précision de la méthode, ces nombres prouvent suffisamment et en toute certitude qu'une diffusion de l'enzyme hors des bactéries mortes n'a pas lieu.

L'uréase est donc un enzyme insoluble, intimement lié à l'organisme mort aussi bien qu'à l'organisme vivant.

Ce résultat a encore été confirmé par l'observation suivante. On inocule des cultures d'urobactéries, vivantes ou mortes, par traits ou en masses à la surface d'une mince plaque d'agar ou de gélatine, et on les y abandonne pendant des semaines et des mois pour donner à l'enzyme, dans le cas où il serait soluble, l'occasion de sortir par diffusion des bactéries et de pénétrer dans la plaque; si on enlève ensuite à la plaque de petits fragments où l'on essaie de déceler la présence d'uréase par le »phénomène de l'irisation«, en plaçant ces fragments sur la plaque de gélatine à eau de levûre avec urée, on ne trouve pas trace d'uréase même dans les fragments pris à des distances aussi petites que possible des traits inoculatoires. On sait que dans ces circonstances la diastase, la pepsine, la trypsine, et même le mucus végétal, l'amidon soluble et la gomme arabique se propagent par diffusion jusqu'à des distances mesurables; on serait donc en droit d'attendre la même chose de l'uréase, même si elle n'était soluble qu'à un très faible degré et constituée par des molécules très complexes.

Après tout ce qui vient d'être dit, il n'y a plus le moindre doute que les »solutions d'uréase« de Musculus [1]), souvent citées, n'étaient actives que parce qu'elles tenaient en suspension quelques urocoques restés invisibles, ce qui n'est guère étonnant vu la petitesse de ces microbes et l'époque déjà lointaine où les expériences ont été faites. Cette possibilité a du reste déjà été exprimée par M. Green [2]).

L'existence d'un enzyme absolument insoluble n'a d'ailleurs plus rien d'inattendu,

[1]) Sur le ferment de l'urée. *Comptes rendus*, 82, 334, 1876.
[2]) The soluble ferments and fermentation, 1890, p. 287.

depuis que j'ai démontré [1]) que l'isatase, l'enzyme qui forme l'indoxyle aux dépens de l'isatan du pastel (*Isatis tinctoria*), ne peut en aucune façon être extrait des cellules mortes de la plante.

10. *Décomposition de l'urée par catabolisme.*

J'ai démontré ailleurs [2]) que l'indican ($C^{14}H^{17}NO^6+3H^2O$), c. à d. la glucoside de l'indigo du *Polygonum tinctorium* et de l'*Indigofera leptostachya,* peut être décomposé par la cellule vivante de deux manières différentes: en premier lieu par des enzymes spécifiques que j'ai amplement décrits, et en second lieu par le contact direct avec le protoplasme vivant, ce que j'ai nommé catabolisme. C'est ainsi que l'on peut démontrer facilement que les bactéries ordinaires de la fermentation des sucres, comme les *Aërobacter aerogenes* et *A. coli* var. *infusionum,* décomposent par catabolisme, tandis que d'autres espèces de microbes, par exemple la levûre de l'acétate d'éthyle et plusieurs levûres du lactose, de même que les cellules des plantes à indican elles-mêmes, se sont montrées actives en vertu d'enzymes spéciaux que l'on pourrait appeler »indicases«.

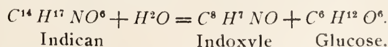
Ce double aspect de la décomposition de l'indican se retrouve d'une manière analogue chez celle de l'urée. Les bactéries décrites auparavant en provoquent l'hydrolyse par l'enzyme uréase, mais quelques bactéries lumineuses marines causent l'uréolyse par le contact direct de leur protoplasme en voie de multiplication, donc par catabolisme, sans qu'il soit possible de déceler la moindre trace d'uréase dans leurs corps morts ou vivants.

Ce ne sont toutefois pas toutes les bactéries lumineuses qui catabolisent l'urée. Parmi celles que je connais le mieux, on rencontre cette propriété chez les diverses variétés de *Photobacter luminosum* et *Ph. indicum,* avec leurs sous-espèces *Ph. splendidum* et *Ph. splendor maris* de la mer du nord [3]). Part contre l'urée n'est pas décomposée par *Ph. phosphorescens* et *Ph. fischeri* et leurs nombreuses variétés. De même les vibrions marins ordinaires (parfois aussi lumineux, mais perdant rapidement leur pouvoir lumineux par culture), ne décomposent pas l'urée; pas davantage les vibrions et spirilles lumineux découverts dans l'Elbe, la Spree et la Saale par MM. Dunbar et Kutscher. Parmi les bactéries lumineuses moins connues, j'ai observé une acti-

---

[1]) Further researches on the formation of Indigo from the Woad (*Isatis tinctoria*), *Proceed. Acad. of Sc. Amsterdam*, 30 June 1900, p 101.

[2]) On Indigo-fermentation. *Proceed. Acad. of Sc. Amsterdam*, 31 March 1900, p. 506. L'action de l'enzyme aussi bien que la décomposition catabolique a lieu suivant la formule



$$C^{14}H^{17}NO^6 + H^2O = C^8H^7NO + C^6H^{12}O^6.$$

Indican — Indoxyle — Glucose.

[3]) *Ph. indicum* a été découvert en 1886 par M. B. Fischer dans l'océan atlantique près de Santa Cruz, et depuis je l'ai retrouvé nombre de fois dans la mer du nord, sur la côte hollandaise, bien qu'à l'état de variétés ou sous-espèces particulières, que j'ai appelées *Ph. splendidum* et *Ph. splendor maris*; toutes trois décomposent énergiquement l'urée. *Ph. luminosum* a été commun dans la mer du nord pendant les années 1888 à 1895 éet à cette époque je l'ai isolé d'animaux marins et de l'eau de mer en milliers de colonies.

vité énergique chez une espèce, commune dans la mer et dans l'estomac des huitres [1]), qui se distingue par une croissance très faible et une dégénérescence rapide dans les cultures (*Photobacter degenerans* Fischer). Enfin il existe encore dans la mer un petit nombre de microbes actifs obscurs, ainsi que j'ai pu m'en convaincre par des expériences d'accumulation [2]), mais je ne les ai pas encore soumis à une étude plus détaillée. Ils sont certainement rares.

Les expériences suivantes prouvent l'action catabolique des espèces que je viens de citer.

Si l'on porte les bactéries lumineuses à étudier sur la gélatine de levûre à urée sans sel marin, précédemment décrite, les bactéries mêmes meurent au bout de très peu de temps, par suite du manque de sel. Quoique la gélatine soit énergiquement liquéfiée, la trypsine sécréteé par ces bactéries étant très active dans ces circonstances, il ne se produit rien de plus: l'urée reste intacte pendant toute la durée de l'expérience. Cela prouve que l'uréase ordinaire fait défaut chez ces bactéries.

Si l'on ajoute au terain de culture 3% de sel marin, on rend ce terrain convenable pour la croissance (mais non pour la luminosité). Si l'on inocule alors sur la plaque les bactéries lumineuses vivantes, elles restent sans action sur l'urée pendant plusieurs heures, même quand elles sont présentes en très grande quantité, ce qui prouve que dans le corps de la bactérie il ne s'amasse pas non plus un enzyme de l'urée actif seulement en présence de sel marin. Mais au bout de quelques heures commence une décomposition énergique de l'urée; on voit se former de larges anneaux de Newton, puis il se forme dans la gélatine un précipité blanc de phosphate et de carbonate de chaux, tout comme dans les expériences avec l'uréase. L'examen microscopique des bactéries apprend que la décomposition de l'urée commence au moment où les bactéries commencent à se segmenter, de sorte que la décomposition est corrélative à la croissance.

Des bactéries mortes sont totalement sans action sur ces plaques d'urée au sel marin. Une uréase speciale, active seulement en présence de sel marin y fait donc aussi complètement défaut.

La décomposition de l'urée par des bactéries lumineuses s'effectue, dans des liquides nourriciers convenables, p. ex. dans du bouillon de poisson à 3% de sel marin et 2 à 3% d'urée, de la même manière que sur les plaques, sans l'intervention d'uréase. Avec *Ph. indicum* le titre alcalin, atteint dans ces circonstances en 48 heures, correspond à environ 80 cm³. d'acide normal pour 100 cm³. de liquide. De 7% d'urée 2% à peu près peuvent être décomposés. En élevant davantage la proportion d'urée on n'observe pas une décomposition plus avancée, et à 10% la décomposition est nulle. Les bactéries n'émettent pas de lumière pendant ces expériences, mais elles n'ont pas perdu pour cela la propriété photogène en l'absence d'urée. La masse des bactéries nouvellement formées est toujours plus faible que dans le même liquide sans urée. Après filtration elle se montre sans action sur ce corps aussi longtemps que les bactéries sont empêchées de croître.

---

[1]) En examinant le contenu de l'estomac d'huîtres américaines vivantes, expédiées de New-York à Rotterdam, j'ai trouvé cette bactérie par millions en culture pure. Dans l'estomac des huîtres hollandaises elles sont plus rares et mêlées à d'autres bactéries lumineuses et obscures.

[2]) Ces expériences ont été faites dans le but d'accumuler pur l'urée les bactéries lumineuses et uréolytiques marines; elles sont restées infructueuses, parce que ces bactéries sont refoulées par les urobactéries obscures.

Une différence essentielle entre la décomposition de l'urée par catabolisme et la décomposition par l'uréase réside, tout comme pour la décomposition de l'indican, dans l'influence que la température a sur les deux phénomènes. Le catabolisme atteint notamment son optimum à la température optimale de croissance, ou un peu plus haut, soit environ à 27° C. pour la bactérie lumineuse indienne dans le bouillon de poisson, tandis que la décomposition par l'uréase, dans le cas où elle provient d'*Urococcus ureae*, atteint son maximum à 45—50° C., bien que pour ce microbe la température optimale de croissance se trouve à viron 23° C., et que la mort survienne ici, du moins à l'état humide, déjà au bout de 2 heures à 45° C., et après quelques minutes à 50° C. Mais par cette température l'uréase n'est point altérée ou ne l'est que fort peu.

La forme plus simple de catabolisme, savoir la décomposition sous l'influence du protoplasme en repos, non en voie de croissance, ainsi qu'on la rencontre dans d'autres processus biochimiques, tels que la respiration et la fermentation alcoolique, n'a pas encore été observée à propos de la décomposition de l'urée. Il n'est pas improbable pourtant que l'extension de nos connaissances comblera cette lacune, car la décomposition de l'urée par l'uréase d'une part, et d'autre part la forme de catabolisme que nous venons de décrire, qui peut être nommée »auxocatabolisme« (ou brièvement »auxobolisme«) à cause de sa relation avec la croissance, sont les termes extrêmes d'une série de processus dont le milieu serait occupé par l'action catabolique du protoplasme en repos.

Explication de la planche.

Le grossissement est partout de 1000 diamètres. Les cils ont été colorés d'après la méthode de M. Zettnow. Les figg. 1, 4 et 5 sont des photographies de préparations vivantes.

Fig. 1. *Urobacillus pasteurii* Miquel. Culture vivante âgée de 15 jours, sur du bouillon de viande à gélatine et carbonate d'ammonium.

Fig. 2. *Urobacillus pasteurii* avec cils péritriches. Culture très jeune sur du bouillon de viande à agar et carbonate d'ammonium.

Fig. 3. *Urobacillus miquelii* n. sp. avec cils péritriches. Culture sur l'agar de viande, jeune. Ne produit pas de spores.

Fig. 4. *Urobacillus leubei* n. sp. Culture vivante, sur de la gélatine à bouillon de viande. La coloration des cils n'a pas réussi, les cils sont probablement péritriches. Spores oblongues.

Fig. 5. *Planosarcina ureae* n. sp. Culture vivante, sur gélatine de viande. Les spores sont sphériques.

Fig. 6. *Planosarcina ureae*, avec cils péritriches, recouvrant d'une abondante chevelure le corps de la sarcina.

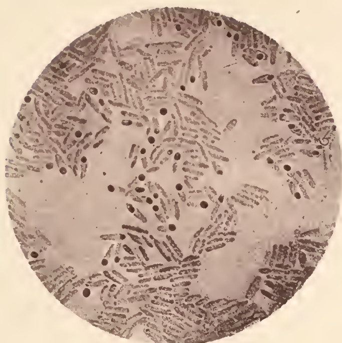


Fig. 1.

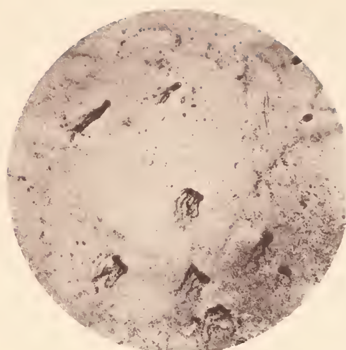


Fig. 2.

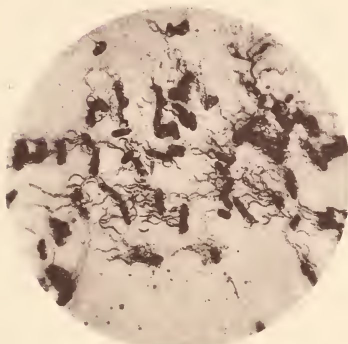


Fig. 3.

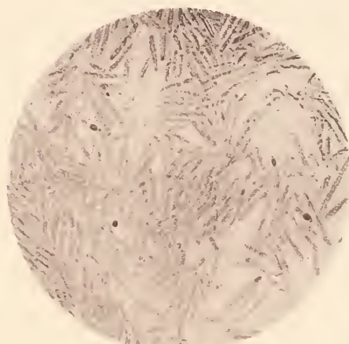


Fig. 4.

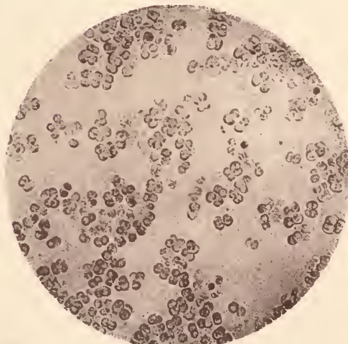


Fig. 5.

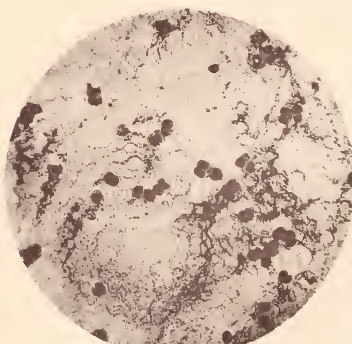


Fig. 6.

Fig. 1 et 2 *Urobacillus pasteurii*. Fig. 3 *U. miquelii*. Fig. 4 *U. leubei*.
Fig. 5 et 6 *Planosarcina ureae*.
Grossissement 1000.

Sur des microbes oligonitrophiles[1]).

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome VIII, 1903, p. 190—217. — Verscheen onder den titel »Over oligonitrophile bacteriën« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel IX, 1901, blz. 633—642; en onder den titel »On oligonitrophilous bacteria«, Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen. Amsterdam, Vol. III, 1901, p. 586—595; en onder den titel »Ueber oligonitrophile Mikroben« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, VII. Band, 1901, S. 561—582.

Je désigne sous le nom d'»oligonitrophiles« ces microbes qui, dans la libre concurrence avec les autres microbes, se développent dans des milieux nourriciers où l'on n'a pas introduit avec intention des composés azotés, mais d'où l'on n'a pas non plus pris soin d'enlever les dernières traces de ces composés. Ils ont la propriété de fixer, soit seuls, soit en symbiose avec d'autres microbes, l'azote atmosphérique libre, afin de s'en servir comme nourriture.

Ils prêtent à deux séries d'expériences d'accumulation, différentes en principe. On peut notamment les laisser se développer: 1°. A la lumière, aux dépens de l'acide carbonique de l'air, et l'on obtient alors des organismes oligonitrophiles colorés par de la chromophylle. 2°. Dans l'obscurité, en présence de nourriture à carbone, ce qui donne des oligonitrophiles incolores.

J'ai fait des expériences dans les deux conditions; les épreuves à la lumière sont de longue durée et ne sont pas encore terminées. Elles ont cependant déjà fourni un résultat dont je parlerai en premier lieu et qui m'a engagé à continuer l'étude de la question dans divers sens. Je communiquerai ensuite quelques résultats obtenus avec des organismes oligonitrophiles incolores.

1. *Oligonitrophilie chez les Cyanophycées.*

L'expérience a été faite de la manière suivante:

De grands ballons bouchés de telle façon que l'on y pouvait introduire de temps en temps de l'air, privé de toute combinaison azotée par un lavage dans l'acide sulfurique concentré, et d'une capacité de 3 litres ou plus, furent remplis pour la moitié environ d'une solution composée de

Eau de conduite ou distillée	100 gr.
K^2HPO^4	0,2 gr.

sans addition d'aucune autre substance; cette solution fut infectée par 1 à 2 gr. de

[1]) Traduit de *Centralblatt f. Bakteriologie etc.*, 7, 561, 1901.

terreau [1]). Pendant l'hiver j'ai placé ces ballons devant une fenêtre exposée au sud, au printemps et pendant l'été au nord-ouest, par une température ambiante de 16 à 20° C. Il se forme au commencement une pellicule de phosphate de calcium que l'on fait disparaître en secouant les ballons. L'eau de la distribution ne contenant que peu de combinaisons organiques, il ne se produit aucun trouble dû à des microbes incolores. Par contre, au bout de 8 semaines pendant l'hiver et de 4 à 5 semaines pendant l'été, il se développe *une flore caractéristique, formée de plusieurs espèces de Cyanophycées.* Une fois qu'elle a pris naissance, cette flore croît rapidement en donnant au liquide une couleur vert bleuâtre ou vert de gris.

Au commencement les Cyanophycées se développent comme des colonies isolées, fortement adhérentes aux parois du ballon; plus tard il s'en forme des pellicules, une vraie »floraison de l'eau«, constituée principalement par des *Anabaena,* notamment *A. catenula.* Les colonies de cette espèce, fixées aux parois, s'étendent rapidement en formant une mince couverture. J'ai trouvé encore un plus grand nombre d'individus d'une espèce vert bleuâtre foncé, voisine de *Nostoc paludosum* ou peut-être même identique avec lui; elle commençait par adhérer au verre et plus tard elle flottait librement dans l'eau. Plus rarement on observe çà et là une masse mucilagineuse bleu verdâtre, reconnue comme *Nostoc sphericum* [2]). Toutes ces espèces appartiennent, comme on voit, aux Cyanophycées immobiles; les Oscillariées mobiles ne se développent pas, dans ces conditions, d'une part parce que le liquide de culture, bien qu'on n'y eût introduit que 1 à 2 gr. de terreau par litre, contenait cependant trop de matières organiques pour permettre leur développement, et en second lieu parce que ces organismes n'appartiennent pas aux oligonitrophiles, mais ont besoin pour leur croissance de quantités notables de composés azotés.

Dans ces cultures les Chlorophycées, particulièrement *Chlorococcum* et *Chlorella,* ne font pas complètement défaut, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, mais elles sont présentes en si petite quantité que ce n'est que par l'examen microscopique qu'on les découvre. Ce fait est surtout remarquable parce que l'expérience apprend qu'un liquide de culture dont la composition est:

Eau de conduite	100 gr.
K^2HPO^4	0,02 gr.
NH^4NO^3	0,02 gr.

et qui a été infecté par une trace d'une culture de Cyanophycées obtenue précédemment, se recouvre déjà après 3 ou 4 semaines d'une pellicule verte, essentiellement constitutée par le *Chlorococcum infusionum.* Ce n'est que beaucoup plus tard, quand les combinaisons azotées sont consommées, que l'on voit la couleur se foncer parce qu'il commence à se développer des *Anabaena.* Dans ces conditions de culture je n'ai

---

[1]) A Delft l'eau de conduite contient par litre 0,42 mg. d'azote et le terreau privé d'eau 0,56 %. Cet azote présent dans le sol y existe toutefois sous une forme qui le rend assimilable pour une très petite partie seulement par les Cyanophycées et les autres microbes. Aussi est-il prouvé que les organismes oligonitrophiles ont la propriété de pouvoir assimiler l'azote libre de l'air soit tout seuls, soit en symbiose avec certains autres microbes. Je communiquerai plus tard les observations qui s'y rapportent.

[2]) Je n'ai pas pu déterminer toutes les espèces de Cyanophycées obtenues dans mes expériences; il se peut que quelques-unes n'aient pas encore été décrites.

pas obtenu d'autres espèces que ces *Anabaena*, mais il se peut que cela ait tenu à un état fortuit de la matière servant à l'infection.

Quand je n'infectais pas avec du terreau et que je me servais, non de l'eau de la distribution, mais d l'eau puisée au grand canal à Delft, une eau peu différente de celle de la Meuse et assez semblable par conséquent à l'eau fluviale ordinaire, avec cette différence toutefois qu'elle est plus fortement contaminée par des corps organiques, l'allure de l'expérience était autre. Il se forme notamment alors une riche culture de *Diatomées*, qui se dépose sur la paroi du ballon ou reste flottante, mélangée de quelques Chlorophycées des genres *Raphidium*, *Chlorella*, *Chlorococcum* et *Scenedesmus*, sans que la culture perde par là son caractère de Diatomées. Beaucoup plus tard, c'est à dire après 8 à 10 semaines, la couleur de la culture passe du brun au bleu verdâtre, parce que les Cyanophycées commencent alors à se développer, et ce développement continue aussi longtemps qu'il reste une quantité suffisante de phosphate de potassium et des autres nourritures minérales.

Il me semble que l'on peut expliquer comme suit cette expérience frappante: l'eau du canal contient beaucoup plus de substances organiques et surtout plus de composés azotés assimilables que l'eau de la distribution; aussi longtemps que ces substances sont présentes il ne peut se développer que des Diatomées, qui supportent, comme on sait, une grande quantité de substances organiques. Dès que ces substances sont consommées par les microbes, et que les combinaisons azotées ont été transformées en Diatomées, les Cyanophycées oligonitrophiles sont capables de supporter la concurrence et le caractère de la flore est totalement modifié.

L'expérience suivante, bien simple, prouve que réellement les Diatomées peuvent supporter, dans leurs liquides nourriciers, une forte proportion de substances organiques et surtout de composés azotés assimilables, comme des sels d'ammoniaque et du salpètre. Un grand verre cylindrique est rempli à moitié de terreau de jardin et pour l'autre moitié d'eau pure; on agite fortement le tout et la bouillie est placée devant une fenêtre. Au bout de quelques jours ou de quelques semaines, cela dépend de la température et de la saison, on voit se déposer sur le verre, du côté éclairé, une couche brun foncé de Diatomées, formée d'abord par les Diatomées qui sont sorties du terreau en rampant vers la lumière, et se sont ensuite fortement développées par croissance et multiplication. Après quelques mois le dépôt est remplacé plus ou moins complètement par des Chlorophycées, et cela se produit évidemment quand les Diatomées, ainsi que certains autres microbes comme les bactéries, ont consommé la plus grande partie des substances organiques assimilables en les transformant en matières impropres à l'assimilation. Dans ces conditions toutefois les Cyanophycées ne se développent pas encore, parce que la proportion des composés azotés restants est encore beaucoup trop élevée.

Bien que je considère comme certain que, dans mes expériences avec de l'eau de la distribution ou puisée au canal, la flore des Cyanophycées ne se développe que quand la proportion des substances organiques dans le liquide de culture est devenue très faible, je considère cependant cette très faible teneur comme ayant une importance capitale pour la réussite de l'expérience. J'ai pu m'assurer dans tous les cas qu'en l'absence presque complète de substances organiques il se produit des phénomènes tout autres, sans que je puisse toutefois communiquer pour le moment aucun résultat décisif obtenu dans ces conditions.

En principe l'expérience de culture de Cyanophycées ici décrite n'est pas absolument nouvelle; elle a en effet été faite déjà en 1892 par MM. Schlösing fils et Laurent, mais dans des conditions assez différentes [1]). Ces auteurs ne se sont notamment pas servis de liquides de culture, mais ont opéré sur une couche de sable et dans des conditions beaucoup plus compliquées que les miennes. Le point important, c'est qu'ils ont observé comme moi le développement à la lumière d'une flore de Cyanophycées, quand les combinaisons azotées faisaient complètement défaut et que l'acide carbonique était la seule source de carbone. Ils sont arrivés à ce résultat que ces Cyanophycées assimilent de l'azote libre, en quantités très faibles il est vrai, mais parfaitement mesurables. Leurs expériences ne sont toutefois pas complètement convaincantes, parce que leurs cultures ont certainement contenu beaucoup d'autres microbes encore, comme des bactéries; cependant, en égard à mes propres expériences, je considère leur opinion comme exacte.

L'oligonitrophilie des Cyanophycées rend compte en quelque sorte des deux observations suivantes: M. Graebner [2]) a constaté qu'un terrain sableux frais, quand il se transforme en tourbière de bruyère, commence par se recouvrir d'une végétation de Cyanophycées, qui penètre jusqu'à quelques mm. au-dessous de la surface. Et M. Treub, qui a visité l'île de Krakatau trois ans après l'eruption qui la dévasta, a trouvé que les cendres volcaniques portaient une couche de Cyanophycées (mobiles?) parmi lesquelles il cite spécialement *Lingbya verbeekiana* et *L. minutissima* [3]). Si l'on rejette complètement la théorie de la génération spontanée, on pourrait donc se figurer que des germes de Cyanophycées, provenant de l'espace universel, aient été les premiers habitants de la terre, puisque nous ne connaissons pas d'autres organismes capables de former leur substance aux dépens de l'acide carbonique et de l'azote libre de l'air.

Du moment que j'eus compris la condition capitale de la culture des Cyanophycées, il m'était facile d'obtenir, sur un substratum solide, des cultures pures des formes qui avaient pris naissance dans des milieux liquides. Je me suis servi à cet effet de plaques de silice ou d'agar d'où j'avais extrait, par un lavage prolongé à l'eau, toutes les substances organiques solubles, et qui contenaient environ 0,02% de K^2HPO^4. Quand j'ensemençais sur ce terrain les cultures en liquides de Cyanophycées, il s'y développait, par une exposition à la lumière devant une fenêtre au nord, en moins de quinze jours les colonies d'*Anabaena* très étendues et fortement ramifiées. Quelque temps après il s'y formait aussi les colonies, plus petites et plus compactes, des autres espèces.

Les plaques doivent être préparées avec beaucoup de soin, car, quand il y reste trop de matières organiques, il ne s'y développe que des bactéries et des *Chlorella* [4]),

---

[1]) Fixation de l'azote libre par les plantes. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, T. VI, p. 832, 1892. Dans leurs cultures les auteurs ont trouvé principalement *Nostoc punctiforme*, *N. minutum* et *Cylindrospermum major*.

[2]) Studien über die norddeutsche Heide. *Botan. Jahrb*, 20, 1895.

[3]) Notice sur la nouvelle flore de Krakatau, *Ann. d. Jard. Bot. d. Buitenzorg*. 7, 1888.

[4]) Les chlorelles, comme beaucoup d'autres Chlorophycées inférieures, supportent sans préjudice, comme je l'ai fait voir antérieurement, une grande proportion de substances organiques.

mais pas de Cyanophycées. C'est pourquoi je n'opère le lavage que quand la plaque a déjà été coulée dans la boîte en verre, notamment de telle manière que la boîte est placée dans une grande cuvette de verre, dans laquelle je laisse circuler jour et nuit de l'eau fraîche de la distribution. Pour introduire le phosphate de potassium dans les plaques, je verse sur ces dernières une solution de ce sel, et j'y laisse séjourner cette solution en la déversant et la renouvelant de temps à autre. Finalement je chauffe quelque peu la plaque au-dessus de la flamme d'un bec de gaz, afin d'éloigner les gouttes d'eau qui y adhèrent et ne conserver pour la semence de Cyanophycées qu'une surface d'agar »sèche«.

Les Cyanophycées mobiles, comme les Oscillariées et les espèces voisines, ne croissent pas sur ce terrain de culture; quand on les y transporte, elles meurent même au bout de peu de jours. Pourtant, M. A. van Delden parvint à obtenir dans mon laboratoire une culture pure d'une pareille espèce mobile, apparentée à l'*Oscillaria* et provenant de l'eau du canal de Delft. Il y réussit en prenant les deux précautions spéciales suivantes: d'abord il fallait extraire de l'agar les substances organiques beaucoup plus complètement que dans le cas précédent, à quoi l'on parvient en se servant d'un courant d'eau distillée pour le lavage; en second lieu il fallait introduire une petite quantité d'un composé nitré; le nitrate d'ammonium fut reconnu comme le mieux approprié. Un terrain d'agar, préparé de cette façon, est en même temps propre à la culture de plusieurs espèces de *Chlorophycées*, qui pour la plupart sont très sensibles à des traces de substances organiques. Mais revenons au groupe des oligonitrophiles, qui présentent la propriété spécifique de pouvoir vivre presque sans azote en combinaison, puisqu'ils sont capables d'assimiler l'azote libre.

2. *Aérobiose et anaérobiose chez les bactéries oligonitrophiles Bactéries méso- et polynitrophiles.*

La »culture élective« d'organismes oligonitrophiles, dans des liquides de culture où le sucre fournit le carbone organique, a été effectuée pour la première fois par M. Winogradsky[1]), notamment dans des circonstances où l'anaérobiose était possible, et où il se formait toujours une forme déterminée de ferment butyrique que cet auteur a appelée *Clostridium pasteurianum*. M. Winogradsky se servait de solutions contenant 2 à 4% de glucose, la quantité nécessaire de nourriture minérale et 2 à 4% $CaCO^3$, mais dans lesquelles il n'introduisait pas avec intention de composés azotés. Ces solutions remplissaient en partie de grands ballons de verre à fond plat, bouchés de telle façon que l'air y pouvait être renouvelé de temps en temps et remplacé par un air purifié au moyen d'acide sulfurique concentré. A cet effet le bouchon était traversé par deux tubes de verre, dont l'un débouchait à peu près à la surface du liquide, tandis que l'autre s'arrêtait dans le goulot. L'infection s'obtenait au moyen de terreau. Il commençait par se développer une riche flore d'organismes aérobies, ce qui rendait possible dans la suite l'anaérobiose du ferment butyrique oligontrophile. Il a opéré également avec des cultures pures de cette espèce, en l'absence de l'air et en introduisant de l'azote dans les ballons de culture.

---

[1]) Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. *Arch. des Sc. biol. St. Pétersbourg*, T. III, 1895, n°. 4.

En répétant ces expériences, j'ai observé que la présence de traces de composés azotés est nécessaire pour le développement du ferment butyrique; la même remarque s'applique d'ailleurs aux organismes oligonitrophiles que j'ai découverts, en ce sens que dans des liquides de culture, préparés avec des précautions telles que l'azote combiné y fait complètement défaut, la croissance de ces organismes est très faible et s'arrête même bientôt, aussi bien dans les cas d'aérobiose que dans les cas d'anaérobiose dans une atmosphère d'azote.

Les conditions de mes propres expériences différaient de celles dans lesquelles travaillait M. Winogradsky en ceci, que je ne permettais que l'aérobiose ou du moins que je laissais pénétrer l'oxygène en telles quantités que la fermentation butyrique était rendue impossible ou tout au moins considérablement réduite. J'employais d'ailleurs d'autres sources de carbone. Il en est résulté la découverte d'un genre de bactéries oligonitrophiles non encore décrites, appartenant aux aérobies. A ce genre, aisément reconnaissable à la grosseur de ses individus, je donnerai le nom d'*Azotobacter*[1]). J'en ai reconnu jusqu'ici deux espèces différentes. L'une, *A. chroococcum,* est très répandue dans le terreau des jardins comme d'ailleurs dans tous les sols fertiles[2]); l'autre est tout aussi répandue dans l'eau du canal de Delft.

Dans mes expériences je rendais facile l'accès de l'oxygène en recouvrant le fond d'un grand ballon d'Erlenmeyer d'une couche peu profonde du liquide nourricier, dans lequel s'opérait la culture; je renouvelais d'ailleurs l'air à la façon de Winogradsky. Comme le ferment butyrique ne peut pas exister en l'absence complète d'oxygène, mais est un organisme »microaérophile«, c. à. d. que pour se bien développer il a besoin d'oxygène, d'une faible pression il est vrai (ce que M. Winogradsky n'a pas remarqué), le libre accès de l'air n'est pas à lui seul un préservatif suffisant contre le développement de ce ferment dans les cultures aérobies. C'est pourquoi je me suis servi dans mes expériences de sources de carbone que l'*Azotobacter* assimilait facilement, mais qui n'entrent que difficilement ou même pas du tout en fermentation butyrique. J'ai trouvé comme substances particulièrement bien appropriées: la mannite en solution de 2 à 10%, et les propionates de calcium, de potassium ou de sodium, en solutions de ½%. La fermentation butyrique ne s'opère que difficilement ou lentement dans la mannite, elle ne s'opère pas du tout dans ces propionates. Le saccharose et le glucose se prêtent moins bien à ce genre d'expériences parce que ces sucres, surtout le glucose, se transforment très aisément en acide butyrique en l'absence de combinaisons azotées. Il est vrai qu'une faible fermentation butyrique, du moins en présence de carbonate de calcium, n'est pas fort préjudiciable à mon expérience, parce que les butyrates sont des sources de carbone faciles à assimiler pour le *Chroococcum.*

---

[1]) Peut-être le nom de *Parachromatium,* qui indique la parenté de notre microbe avec le genre *Chromatium* de M. Winogradsky, serait-il préférable. Des considérations physiologiques m'avaient d'abord conduit à une tout autre opinion, mais des études ultérieures me portent à croire que cette parenté générique est indubitable. M. Zettnow, en examinant mes préparations, avait déjà émis la même opinion.

[2]) Outre le terreau de jardin j'ai encore examiné: le sol d'une prairie, pris à diverses profondeurs, de l'argile d'un champ de froment, du sable des dunes provenant d'un champ de pommes de terre, ainsi que du fumier de feuilles, le tout avec le même résultat. Le sable des bruyères, au contraire, ne contient pas *l'Azotobacter.*

En tâchant d'obtenir des cultures pures des organismes oligonitrophiles sur substrat solide, j'ai reconnu que les bactéries saprophytes ordinaires, dont les germes foisonnent dans les matériaux d'infection, ne se développent pas, ou presque pas, dans les accumulations, ce qui provient de l'alimentation azotée insuffisante, de sorte que l'on peut qualifier ces bactéries de »polynitrophiles«. Certaines autres espèces se comportent de façon intermédiaire au point de vue de l'alimentation azotée, et seront considérées d'un peu plus près au § 4, sous le nom de »mésonitrophiles«.

C'est le moment de faire remarquer un autre point encore, par lequel se caractérisent les organismes oligonitrophiles aérobies. Ils ne forment notamment pas de spores, ce qui a pour conséquence que des expériences entreprises avec du terreau chauffé dans l'eau bouillante ne conduisent pas à des cultures de *Chroococcum*. Il en est autrement du ferment butyrique; celui-ci forme des spores qui résistent parfaitement à des températures de 90 à 100° C. Bien que la fermentation butyrique mise en train par de la terre pasteurisée s'effectue plus lentement et moins bien qu'avec de la terre fraîche, on constate cependant en principe les mêmes phénomènes, sauf pour les symbiontes plus ou moins accidentels qui sont bien différents dans les deux cas [1]). Quand je traiterai les organismes mésonitrophiles, je parlerai d'une espèce particulière et intéressante de ce groupe, et qui se présente très souvent après la pasteurisation, quoique pas toujours, comme symbionte des oligonitrophiles proprement dits, savoir le *Granulobacter sphericum*.

3. *Accumulation d'Azotobacter chroococcum du terreau de jardin.*

J'ai obtenu de très riches cultures de la façon suivante, très simple.

Un liquide nourricier composé de

Eau de conduite	100
Mannite	2
K^2HPO^4	0,02

est introduit en couche peu profonde dans un ballon d'Erlenmeyer, infecté avec une grande quantité, p. ex. 0,1 à 0,2 gr., de terreau frais, et exposé à une température de 27 à 30° C. Par la présence de K^2HPO^4 la réaction est faiblement alcaline [2]) et il se sépare peu à peu du phosphate de calcium sous forme d'une mince couche superficielle, formée de petits sphérites. Des combinaisons azotées autres que les faibles quantités contenues dans l'eau et la terre font ici complètement défaut, mais ces faibles quantités sont nécessaires pour le succès de l'expérience; sans elles il ne se développe que peu de microbes, comme nous l'avons vu, et ce développement

[1]) De nombreuses expériences nouvelles me font croire que cette dernière assertion, basée sur l'autorité de M. Winogradsky plus que sur ma propre expérience, n'est exacte que quand il y a beaucoup de carbonate de calcium en présence. J'ai reconnu qu'en l'absence de cette substance *l'azote libre n'est fixé que quand le Chroococcum existe dans la masse, mais la quantité d'azote combiné peut même être triplée quand les cultures contiennent en même temps le ferment butyrique ou un de ses congénères.* Mais cette question sera traitée amplement dans un travail ultérieur.

[2]) La réaction alcaline est avantageuse pour l'expérience. On peut aussi se servir de KH^2PO^4, mais alors le résultat est incertain.

s'arrête bientôt, ce qui s'applique non seulement au *Chroococcum* mais aussi au ferment butyrique. Des quantités quelque peu considérables d'azote combiné sont toutefois préjudiciables. C'est ainsi que l'expérience ne réussit pas quand la solution nutritive contient plus de 10 mg. de KNO^3 par litre, tandis que des quantités plus faibles encore d'autres composés azotés sont déjà suffisantes pour rendre impossible la concurrence du *Chroococcum* avec les nitrophiles. Toutefois, même des quantités bien plus grandes d'azote combiné ne gênent en rien le développement des *cultures pures* de notre bactérie; elles sont même avantageuses pour sa croissance.

Dans les accumulations, le *Clostridium pasteurianum* de M. Winogradsky se comporte de façon un peu différente vis à vis de l'azote combiné. De notables quantités d'azote combiné, introduites avec intention, servent d'abord à la croissance des formes polynitrophiles ordinaires, et la fermentation butyrique commence normalement dès que la diphénylamine et l'acide sulfurique ne permettent plus de déceler des nitrates ou des nitrites, et que l'on ne trouve plus de sels ammoniacaux au moyen du réactif de Nessler.

Dans la solution nourricière pauvre en azote que nous venons de décrire, il se produit à 30° C., au bout de 2 ou 3 jours, à la surface de la solution une pellicule formée par la remarquable bactérie à grandes cellules: l'*Azotobacter chroococcum.* Cette pellicule superficielle se développe pendant plusieurs jours, semblable à une Mycoderme, et se peuple de diverses espèces de petites bactéries, d'amibes et de monades, et parfois même d'infusoires. Les petites bactéries ont besoin de plus d'azote combiné que le *Chroococcum,* mais moins que les espèces »polynitrophiles« saprophytes ordinaires; on peut donc les appeler »mésonitrophiles«. Par leur nombre elles se comportent vis à vis de *Chroococcum* comme les bactéries acétifiantes vis à vis de *Saccharomyces mycoderma* dans une pellicule mycodermique sur de la bière gâtée; leur présence ne se reconnaît qu'au microscope et ne se trahit pas par des caractères visibles de la couche de *Chroococcum.* Par une analyse chimique leur présence ne serait reconnue qu'avec peine. Si l'on fait l'expérience avec du propionate de calcium à 0,5% comme source de carbone au lieu de mannite, et en infectant avec du terreau, on obtient au bout de 3 à 4 jours des pellicules de notre espèce qui ne laissent voir au microscope que peu d'autres bactéries ou' n'en présentent même pas du tout, mais on les découvre toujours par culture sur un substratum solide. Il est remarquable que la présence des organismes mésonitrophiles est avantageuse pour la croissance du *Chroococcum* et que, quand ils font défaut, comme dans les cultures pures, on n'obtient jamais les belles pellicules des accumulations grossières. Mais je reviendrai encore plus loin sur ces faits. Les bactéries saprophytes polynitrophiles ordinaires, comme les fluorescentes, les espèces d'*Aerobacter, Proteobacter, Saccharobacter* et les bactéries du foin sont rares dans les cultures d'*Azotobacter* et y font souvent complètement défaut, bien qu'elles soient nombreuses dans les matériaux d'infection. Comme les moisissures et les levûres font complètement défaut au commencement, nous avons ici un nouveau cas d'une expérience d'accumulation parfaite, dont j'ai décrit un autre exemple à propos des bactéries de l'urée [1]).

La présence d'amibes dans les pellicules de *Chroococcum* mérite une mention

---

[1]) Ces *Archives,* (2), 7, 28, 1902.

spéciale, parce que ces organismes se nourrissent de préférence de *Chroococcum* et se multiplient avec une telle rapidité qu'ils peuvent causer de grands ravages dans les cultures de cette espèce. On en trouve plusieurs formes qui se développent en abondance sur les terrains solides appropriés aux cultures pures de *Chroococcum*. Ces amibes y forment ces membranes pures que j'ai décrites antérieurement sous le nom de »voile« [1]) et qui sont exemptes de bactéries, de sorte qu'elles peuvent devenir le point de départ pour la culture pure des amibes, qui se laissent facilement isoler des voiles, et se combiner avec d'autres microbes qui leur servent de nourriture. Bref, l'accumulation de *Chroococcum* est une expérience qui en même temps se prête bien à l'étude des amibes.

Mais revenons à notre bactérie elle-même.

Notre expérience d'accumulation n'exige pas nécessairement l'emploi de mannite ou de propionates, mais donne encore de bons résultats, quoique moins certains, avec plusieurs autres combinaisons du carbone. C'est ainsi que j'ai pu remplacer la mannite par du glucose, du lévulose, du lactose, du saccharose et du maltose, et dans tous ces cas j'ai obtenu de riches cultures de *Chroococcum*. Le glucose et le saccharose donnent cependant des pellicules mucilagineuses, qui tombent bientôt au fond. Le glucose et le lévulose donnent aisément lieu à une fermentation butyrique; le saccharose, le maltose et le lactose aussi, quoique moins facilement. Ces espèces de sucres ne peuvent donc être employées comme nourriture qu'en solution dans des couches peu épaisses et bien aérées des liquides nourriciers, pour empêcher plus ou moins complètement cette fermentation due à l'absence de l'air.

La glycérine est moins bien appropriée parce qu'on ne peut s'en servier qu'en faibles concentrations, p. ex. 2 à 3% tout au plus, et encore la pellicule ne se forme-t-elle que lentement. Cependant les cultures que l'on obtient ainsi finissent par être très pures, et ne contiennent plus alors que très peu d'autres bactéries, mais beaucoup d'amibes. J'ai observé la même chose en employant de l'alcool éthylique qui, en solution à 2%, se prête bien à la culture de l'*Azotobacter*, mais est également favorable au développement des amibes.

Le *Chroococcum* ne peut pas du tout se nourrir avec le sucre de lait, que le ferment butyrique assimile très bien au contraire.

Les substances suivantes sont aussi bien assimilables; je les ai rangées d'après le degré d'assimilabilité, en ce sens que les premières substances s'oxydent le plus facilement. Ce sont: les propionates, les butyrates, les lactates, les malates, les succinates, les acétates et les citrates. Les produits de l'oxydation sont de l'anhydride carbonique et de l'eau. Le *Chroococcum* n'attaque ni les tartrates ni les formiates.

On peut conclure de cet aperçu que notre espèce sera capable de se nourrir encore avec beaucoup d'autres sources de carbone que celles que je viens de nommer. Dans tous les cas le pouvoir oxydant de cette bactérie est très développé et peut être comparé le mieux avec celui des bactéries fluorescentes, qui se distinguent toutefois du *Chroococcum* par leur besoin beaucoup plus grand d'azote combiné.

La membrane impure du *Chroococcum*, obtenue sur les milieux nourriciers mentionnés, est constituée au commencement par des bâtonnets très gros et courts (4 μ d'épaisseur sur 5—7 μ de longueur), arrondis aux extrémités et restant parfois

[1]) *Centralbl. f. Bakt. etc.*, (1), 19, 257, 1896 et 21, 101, 1897.

groupés en très grands diplocoques [1]). C'est ce que l'on reconnait à la Fig. 1 de la planche, faite toutefois d'après une culture pure (voir § 5). La plupart des cellules sont en repos, mais quelques exemplaires se meuvent lentement. La paroi cellulaire est constituée par une membrane mucilagineuse d'épaisseur variable, qui est directement visible ou que l'on peut aisément rendre visible, quand le pouvoir réfringent de la paroi diffère trop peu de celui de l'eau pour qu'elle soit nettement accusée, en introduisant dans la préparation une espèce quelconque d'une petite bactérie qui, ne pouvant pénétrer dans la paroi, permet d'en reconnaître le contour comme le laisse voir la Fig. 2. Pour l'explication de cette figure je renvoie d'ailleurs au § 5 où je parle des cultures pures.

Quelques cellules de cultures jeunes (Fig. 1) laissent voir une grande vacuole, très nette, située contre la paroi. Les cellules nourries de mannite forment parfois de la graisse (voir Fig. 4) qui se distribue dans les cellules d'une manière très régulière, comme des gouttelettes d'huile. Avec du saccharose et du glucose il se forme moins de graisse, mais le dépôt de mucus autour de la cellule est beaucoup plus considérable.

A mesure que les cultures deviennent plus âgées la membrane surnageante change de couleur et de structure; elle devient d'abord brune, plus tard même noire, et par suite d'une segmentation répétée des bactéries elles-mêmes il se forme des paquets semblables à des sarcines. Cela ne s'opère toutefois pas toujours avec la même facilité, mais dépend notamment de la source de carbone employée: c'est ainsi qu'avec du sucre la formation directe des sarcines brunes est difficile, tandis qu'elle est aisée au moyen de butyrates et même avec du sucre quand il y a eu précédemment une fermentation butyrique. La Fig. 3 représente l'état brun, obtenu par culture pure sur l'agar au glucose. La substance colorante brune est insoluble dans les dissolvants ordinaires, comme l'eau, l'alcool, l'éther, le chloroforme et le sulfure de carbone; elle se dissout difficilement dans les alcalis, en subissant une décomposition. Elle diffère complètement de la chromophylle. C'est en raison de cette substance colorante que j'ai choisi le nom spécifique de *chroococcum*.

Ainsi que je l'ai déjà dit, le changement de couleur est accompagné d'un changement notable dans l'apparence microscopique des bactéries. La plupart des individus diminuent en grosseur et leur forme devient plutôt sphérique, de sorte que l'on ne voit plus les bâtonnets gros et courts des états jeunes, mais des micrococques assez petits. Par suite d'une segmentation répétée, les paquets de sarcines peuvent atteindre des dimensions considérables. De pareilles colonies de sarcines se forment souvent, et directement, quand on se sert de liquides nourriciers artificiels constitués par de l'eau distillée aussi pauvre que possible en combinaisons azotées; elles y peuvent former des membranes assez étendues, dont la croissance continue pendant un temps remarquablement long.

L'A. chroococcum peut facilement donner naissance, surtout dans les pellicules superficielles des accumulations grossières, à des formes d'involution; ces formes

[1]) En faisant usage de liquides nourriciers où des propionates ou des acétates servaient de source de carbone, j'ai obtenu parfois, dans les accumulations obtenues avec du terreau comme matière infectante, une forme beaucoup plus petite, que je considère toutefois comme une variété d'*A. chroococcum*. J'ai isolé de l'eau du canal une deuxième variété d'*A. chroococcum*, dont les cellules sont beaucoup plus longues.

peuvent devenir des cellules géantes, mesurant 10 à 15 μ, donnant l'impression d'amibes ou de cellules de levûre (Fig. 4).

En parlant des cultures pures, je reviendrai sur la formation intense de mucus, qui se produit quand le liquide contient des quantités insuffisantes de composés azotés et lorsque le sucre sert de source de carbone.

4. *Les bactéries mésonitrophiles.*

J'ai déjà dit qu'à la vérité les bactéries »polynitrophiles« saprophytes ordinaires sont rares dans les cultures des oligonitrophiles, mais qu'il s'y développe assez abondamment des espèces particulières que je qualifie de »mésonitrophiles«, en égard à leur besoin d'azote. L'exemple le mieux connu de ce groupe est le *Bacillus radicicola* des tubercules des papilionacées; mais cette espèce je ne l'ai pas rencontrée avec certitude dans les accumulations des oligonitrophiles [1]). Bien que je n'aie pas encore examiné complètement les espèces mésonitrophiles trouvées dans les accumulations, il n'est cependant pas superflu d'en dire quelques mots.

Ces organismes s'observent aussi bien dans la fermentation butyrique d'après les préceptes de M. Winogradsky que dans mes cultures d'*Azotobacter*; ce sont en partie les mêmes organismes dans les deux expériences. Cependant, dans la plupart des fermentations butyriques j'ai rencontré une espèce intéressante que j'ai trouvée plus rarement dans mes cultures du *Chroococcum* sans fermentation butyrique, et que j'introduirai ici sous le nom de *Granulobacter sphericum*. Ainsi que son nom l'indique, cette forme appartient au genre *Granulobacter* que j'ai créé antérieurement [2]), et auquel appartient aussi le *Clostridium pasteurianum*.

Cette espèce, comme toutes celles de ce genre d'ailleurs, produit des spores qui supportent la pasteurisation; même dans les expériences où l'on se sert de terre pasteurisée comme matière d'infection, on peut donc l'observer aisément, et bien souvent elle constitue dans ce cas la seule impureté qui se développe assez abondamment à côté du ferment butyrique.

Le *G. sphericum* est microaérophile, mais à un degré moindre que le ferment butyrique, et il se rapproche par conséquent du type mésoaérophile auquel appartiennent les spirilles; c'est ce que l'on reconnaît le mieux par le fait qu'on peut le cultiver sur des plaques en plein air, ce qui n'est pas le cas avec le ferment butyrique. Quand la solution nutritive a la composition suivante:

Eau de conduite	100
Glucose	2
K^2HPO^4	0,02
$CaCO^3$	2

et que l'infection a été faite par du terreau pasteurisé, il se produit, vers 30° C. et en empêchant le trop libre accès de l'air, au bout de 2 ou 3 jours une fermentation

[1]) Voir la fin de ce paragraphe.

[2]) Je dois faire remarquer ici que le nom générique de *Grànulobacter* s'applique à un genre naturel, c. à d. en relation générique et systématique avec les autres genres, et ne doit pas être considéré comme »morphologique« ainsi que c'est le cas pour le nom *Clostridium*, ou comme »physiologique« ainsi que *Photobacter*.

caractérisée par l'odeur agréable des alcools éthylique et propylique. Cette fermentation est causée par notre bactérie qui se présente au microscope, en partie comme des clostridiums presque sphériques de 1 à 2 μ de diamètre, avec des spores oblongues excentriquement placées, pour une autre partie comme de petits clostridiums ordinaires dont les spores sont situées aux extrémités et un peu sur le côté. Les spores sont petites, mesurent environ 0,3 à 0,5 μ, et sont placées à l'extrémité la plus grosse dans les clostridiums allongés. Traités avec de l'iode, les clostridiums sphériques aussi bien que les oblongs se colorent en bleu intense.

Il est aisé d'obtenir des cultures pures, en transportant les organismes du liquide nourricier en question sur un terrain solide de même composition, mais sans craie, solidifié par 2% d'agar.

On voit souvent les colonies de *G. sphericum* s'y développer immédiatement en culture pure, parce que le ferment butyrique ne peut pas se développer sur ce terrain et que les autres microbes aérobies sporogènes n'existaient pas ou qu'en petite quantité seulement dans l'accumulation faite avec des matériaux pasteurisés. L'absence d'autres microbes aérobies dans ces conditions de culture prouve que parmi les organismes sporogènes il n'y en a aucun qui soit oligonitrophile en dehors du ferment butyrique, puisque dans le cas contraire certains d'entre eux se seraient multipliés dans les ballons ouverts.

On obtient le *G. sphericum* tout aussi bien avec de la terre fraîche qu'avec de la terre pasteurisée, du moins dans l'expérience où se produit une fermentation butyrique, mais on ne l'observe pas quand l'aération dans les accumulations est vraiment complète.

Je n'ai pas réussi à faire croître le *G. sphericum*, d'une façon convenable du moins, sur les milieux nourriciers solides ordinaires, riches en azote. Sur l'agar imbibé d'eau de la distribution et contenant 2% de saccharose et du phosphate de potassium, — terrain très favorable à la croissance des cultures isolées, — ne réussissaient que fort peu d'inoculations; au contraire, on voit bientôt la croissance s'arrêter de sorte que cette espèce dégénère rapidement (comme beaucoup d'autres organismes microaérophiles) lorsqu'elle est exposée au libre accès de l'air pendant trop longtemps.

Une deuxième espèce mésonitrophile remarquable, que l'on rencontre souvent en grandes masses dans les accumulations de *Chroococcum* dans des solutions de mannite infectées au moyen de terreau, est un court *Spirillum*, très facile à reconnaître, d'environ 1 μ d'épaisseur et 1 à 2 μ de longueur. La plupart des individus sont remplis de petites gouttes de graisse qui donnent à l'organisme un pouvoir réfringent tellement élevé qu'il semble noir quand la mise au point du microscope est imparfaite. La »figure de respiration« dans la chambre de verre fait voir avec grande netteté l'accumulation »mésoaérophile«, sous forme d'une ligne fine assez éloignée du ménisque; quand il y a assez de mannite en présence elle se conserve pendant plusieurs jours. Les seules autres bactéries dont le besoin respiratoire, dans ces conditions d'absence presque absolue de combinaisons azotées, est comparable à celui de ce *Spirillum*, sont le ferment butyrique et ses congénères; mais celles-ci sont beaucoup plus fortement microaérophiles, de sorte que dans la chambre de verre elles produisent une ligne de respiration encore plus rapprochée du centre.

Cette espèce prouve que dans le terreau de jardin existent aussi de vrais spirilles. Sa culture pure sera décrite à une autre occasion.

Je devrais encore parler d'une ou deux autres espèces mésonitrophiles, voisines du *Bacillus radicicola,* mais je ne les ai pas encore suffisamment étudiées. J'ai reconnu que ces espèces favorisent considérablement le développement des oligonitrophiles, de sorte que leur examen ultérieur sera certainement fructueux.

5. *Culture pure d'Azotobacter chroococcum.*

L'isolement d'*A. chroococcum* des membranes surnageantes de nos accumulations s'obtient aisément par le transport sur un terrain de culture dont la composition est la suivante:

Eau distillée	100
Mannite	2
K^2HPO^4	0,02
Agar [1])	2

Les 2% d'agar contiennent d'ailleurs une quantité suffisante des autres aliments minéraux nécessaires. Cultivé à 30° C., le *Chroococcum* y donne déjà au bout de 24 heures des colonies semblables à de l'amidon, et contrastant nettement avec les colonies aqueuses, transparentes, des nitrophiles. Il est vrai que ces derniers organismes étaient refoulés par le *Chroococcum* dans les accumulations, mais sur les plaques ils se développent de nouveau, grâce à la présence de composés azotés dans l'agar. Comme toutes les autres espèces cessent de croître au bout de peu de jours, tandis que les colonies de *Chroococcum* continuent à se développer pendant longtemps, et grossissent comme de grandes masses d'un mucus blanc, il est aisé de les reconnaître dans le mélange.

Les cultures pures de *Chroococcum* se développent avec beaucoup de vigueur dans les milieux les plus divers. Je les ai cultivées pendant longtemps sur une gélatine à décoction de feuilles de pois avec 2% de saccharose, sur de l'agar à 4% de glucose et sur de la gélatine de viande ordinaire; sur ce dernier milieu il se produit peu ou point de liquéfaction et la croissance n'est que faible.

Dans des milieux nourriciers liquides, la croissance des cultures pures est notablement favorisée par la présence de petites quantités des composés azotés les plus divers. Surtout les nitrates sont bien assimilés, même dans des concentrations de 1 gr. p. litre. C'est ainsi que j'ai obtenu une croissance assez rapide dans

Eau de la distribution . .	100
Mannite	2—10
K^2HPO^4	0,02
KNO^3	0,1

Les sels d'ammonium ne sont assimilés que difficilement, ce qui n'empêche pas que j'ai observé un développement considérable dans

[1]) Ces plaques d'agar abandonnent du liquide après solidification; il est donc nécessaire de les chauffer avec précaution dans les boîtes de verre mêmes, afin que le liquide superflu se condense sur le couvercle et puisse être enlevé. On comprend que le chauffage doit être suffisamment modéré pour qu'il ne se produise pas une nouvelle fusion. On peut obtenir de cette manière une concentration quelconque d'agar.

Eau	100
Glucose	2
K^2HPO^4	0,02
$(NH^4)^2HPO^4$	0,02

L'asparagine agit à peu près comme les sels d'ammonium; la peptone est d'une assimilation difficile.

De même que les accumulations, les cultures pures deviennent d'un brun foncé quand on les conserve pendant quelque temps, surtout quand le glucose sert de source de carbone et qu'une trace de salpètre sert de source d'azote. Il semble toutefois que les cultures pures changent de caractère à un autre point de vue encore; je n'ai en effet jamais pu obtenir ces belles membranes, semblables à des Mycodermes, qui se produisent toujours dans les accumulations. Il se peut toutefois que la formation de ces membranes soit intimement liée à la présence des nombreux autres microbes [1]). Dans tous les cas les cultures pures, transportées sur le terrain solide dont je viens de parler, se reproduisent pendant longtemps sans modification.

Si l'on transporte sur ce terrain, non le *Chroococcum* en culture pure, mais une solution nourricière contenant ce microbe avec un des mésonitrophiles dont il a été question, sa croissance est certainement activée, surtout quand les microbes associés sont ceux dont nous avons parlé à la fin du § 4, voisins du *Bac. radicicola,* le *Granulobacter sphericum* ou le *Spirillum* terricole. Mais quand on choisit le *Bac. radicicola* lui-même pour remplir le même rôle, on peut aussi observer cette favorisation quoique à un moindre dégré. C'est ainsi que dans une couche peu épaisse de la solution nourricière suivante:

Eau de conduite	100
Saccharose	2
K^2HPO^4	0,02

le *Bacillus radicicola* (provenant d'un trèfle blanc) seul ne donnait qu'une croissance médiocre, caractérisée par la formation de mucus; avec l'*Azotobacter* seul j'observais une assez forte croissance de cellules non mucilagineuses, qui tombaient au fond du liquide; mais quand les deux microbes étaient réunis, la croissance était très forte et accompagnée d'une formation abondante de mucus. Le même résultat s'obtenait avec un organisme mésonitrophile isolé de l'eau du canal. Mais nous verrons dans mon travail ultérieur que l'analyse quantitative du gain en azote ne s'accorde pas toujours avec l'impression de croissance profuse, que l'on acquiert par la simple inspection des cultures, au microscope ou à l'oeil nu.

J'ai entrepris d'ailleurs plusieurs expériences dans le but d'activer la croissance du *Chroococcum* par symbiose avec des algues inférieures. J'ai mis à profit à cet effet quelques-unes de mes cultures pures de Chlorophycées, comme les *Stichococcus major, Chlorella vulgaris, Cystococcus humicola* (provenant de *Parmelia parietina), Pleurococcus vulgaris, Chlorococcum infusionum* et la Cyanophycée *Anabaena catenula.* Ces expériences n'ont toutefois pas encore donné de résultat important.

L'apparence microscopique des cultures pures de *Chroococcum* sur des terrains solides est semblable à celle des membranes des accumulations. Mais comme on est

---

[1]) On verra dans mon travail ultérieur que cette dernière explication est exacte.

ici plus libre dans le choix des aliments, la concurrence étant exclue, je vais entrer dans quelques détails.

On remarque d'abord une grande différence, suivant que l'on cultive avec une nourriture riche en azote ou en présence de traces seulement d'azote combiné et de beaucoup de carbone organique. Dans le dernier cas, surtout quand un sucre assimilable est disponible, il se produit un épaississement colossal de la membrane cellulaire, sous forme de mucus végétal qui se reconnaît ici très nettement comme substance constitutive de la membrane cellulaire. Pour rendre visible cette paroi mucilagineuse, je me suis servi ou bien de bleu de méthylène, qui colore la paroi et le contenu cellulaire avec une intensité inégale, ou de la même méthode que j'ai appliquée à l'examen des membranes des accumulations encore impures, savoir l'introduction dans la culture d'une espèce de quelque petite bactérie, p. ex. une bactérie du vinaigre, qui laisse nettement voir la couche de mucus parce qu'elle ne peut pas y pénétrer. Dans la Fig. 2 on voit l'image d'après nature du bord d'une colonie de *Chroococcum* dans

Eau distillée	100
Agar	2
Mannite	2
K^2HPO^4	0,02,

photographiée en même temps que la bactérie du vinaigre. L'état de développement correspond au commencement de la formation des sarcines, qui peut ici se présenter même dans les vieilles cultures, ce qui fait que dans la figure on voit le protoplasme des cellules du *Chroococcum* comme des sarcines irrégulières. Les parois mucilagineuses des agrégats cellulaires adjacents sont confondues; les petis grains interposés sont les bactéries acétifiantes.

Aussi longtemps que les cultures sur le terrain solide en question sont encore jeunes et croissent rapidement, probablement grâce à la présence de composés azotés facilement assimilables, elles se présentent sous le même aspect que les membranes des accumulations jeunes, ainsi qu'on le voit dans la Fig. 1, qui représente une pareille culture pure, très jeune, mais qui aurait tout à fait la même apparence si elle avait été faite d'après une jeune membrane d'une accumulation sur liquide nourricier. De même que ces dernières, les cultures pures changent souvent de couleur, depuis le blanc jusqu'an brun foncé ou noir; les conditions de ces changements de coloration ne sont toutefois pas encore bien connues. La couleur brune s'obtient surtout quand on nourrit avec du glucose et provient exclusivement de vieux paquets de sarcines, dont les parois cellulaires ne sont pas fortement transformées en mucus. Il est probable qu'il se forme ici des états de repos; dans tous les cas ces cultures brunes font songer à certaines formes de *Fumago* et *Dematium*, dont la substance colorante est probablement la même que celle du *Chroococcum*. Même le contenu cellulaire des formes brun-foncé, représenté p. ex. Fig. 3, rappelle tellement les champignons plus élévés que je viens de citer, que la photographie pourrait passer pour celle d'un de ces organismes. Il est d'ailleurs remarquable que bien souvent il se développe quelques-uns de ces champignons quand les expériences d'accumulation de *Chroococcum* échouent, p. ex. parce que les germes de cet organisme manquaient par hasard dans la matière d'infection, ou bien quand par l'emploi de KH^2PO^4 au lieu de K^2HPO^4 la réaction acide contrarie le développement de notre microbe.

La ressemblance des cultures de l'*A. chroococcum* avec certaines Chroococcacées est également très frappant.

La mobilité de cette espèce est toujours restreinte et ce n'est que dans des cultures très jeunes qu'on peut l'observer facilement. Une pareille culture, âgée de 24 heures seulement, sur eau à l'agar avec saccharose et phosphate de potasse, a été représentée Fig. 1. Le nombre des individus mobiles dans un champ visuel microscopique ne dépasse peut être pas une dizaine et encore la plupart de ces individus s'arrêtent-ils bientôt. Cette circonstance, jointe à la structure mucilagineuse de la paroi cellulaire, était dans mon laboratoire un obstacle à la coloration des cils, mais M. Zettnow a eu l'obligeance de faire avec mes matériaux, cultivés par lui dans un »bouillon à spirilles«, quelques belles préparations qui ont permis de conclure que de beaucoup le plus grand nombre des individus mobiles possèdent un seul cil vibratile polaire. Quelques rares individus en ont certainement plus d'un, placés décidément sur le côté, quoique dans le voisinage du pôle. Les individus non mobiles en sont privés.

Pour les états d'involution, en partie très étranges (Fig. 4), je renvoie à l'explication de la planche.

6. *Azotobacter agilis.*

Cette espèce, que l'on ne trouve pas dans le terreau de jardin, se rencontre dans l'eau du canal de Delft, à côté de l'*Azotobacter chroococcum*, et on peut l'obtenir par l'expérience d'accumulation décrite pour ce dernier. C'est ainsi que j'ai obtenu de belles cultures d'*A. agilis* dans le liquide nourricier suivant:

Eau du canal	100
Mannite	2
K^2HPO^4	0,02,

après exposition en couche peu profonde à une température de 25 à 30° C. L'eau du canal doit être fraîche et non pasteurisée, quisqu'il s'agit de laisser concourir tout son monde microbien, sous des conditions déterminées, avec l'*A. agilis* qui ne forme pas de spores. Bien que l'infection en ce cas ne soit pas produite directement par du terreau, on peut s'attendre cependant à ce que l'*A. chroococcum* se développe en même temps, parce que cette espèce ne fait pas défaut dans l'eau du canal. Aussi cela arrive-t-il réellement de temps en temps et il se peut alors que l'*A. agilis* soit entièrement refoulé. Une des formes du *Chroococcum* que l'on observe souvent dans ces circonstances n'est pas tout à fait identique avec celle que l'on obtient au moyen de terreau, et fut reconnue comme une variété dont les propiétés restent constantes par hérédité dans les cultures pures.

Bien que les cultures pures d'*A. agilis* assimilent le glucose et le lévulose beaucoup plus facilement que la mannite, ce dernier sucre m'a donné de meilleurs résultats que les premiers dans les expériences d'accumulation. Cela provient certainement de la facilité avec laquelle les deux premiers sucres subissent, dans leurs solutions un peu concentrées, une fermentation acide, préjudiciable au développement de l'*A. agilis*. Mais en outre je tiens pour possible qu'une partie de la mannite s'oxyde lentement à l'état de lévulose, sous l'action de bactéries étrangères, surtout des bactéries acétifiantes, qui se rencontrent en grandes quantités dans l'eau du canal à Delft, et que

l'influence favorable de la mannite repose au moins en partie sur cette lente transformation, une solution très diluée de lévulose étant certainement favorable pour l'*Agilis*. En égard à la teneur très variable de l'eau du canal en combinaisons azotées, on pouvait s'y attendre que les expériences avec l'*A. agilis* présenteraient une marche très irrégulière, différeraient au point de vue de la durée du développement et ne réussiraient pas toujours; c'est en effet ce qui a lieu. Dans la plupart des ballons il se forme néanmoins, après 3 à 7 jours, une membrane d'*A. agilis* d'une pureté plus ou moins parfaite. Comme la formation de mucus dans cette membrane est beaucoup moindre que chez *A. chroococcum*, elle est aussi beaucoup moins cohérente, et dans les préparations microscopiques la plupart des individus d'*A. agilis* sont séparés. Dans des préparations toutes fraîches leur mobilité est très faible, mais au bout de quelques instants ils commencent à se mouvoir, et finalement il se peut que tout soit en mouvement. Vu la grandeur extraordinaire et la transparence parfaite de ces bactéries, on peut obtenir ainsi des images particulièrement belles.

En se servant d'un assez grand nombre d'individus pour les préparations microscopiques, on peut obtenir sous le couvre-objet une »figure de respiration« visible à l'oeil nu [1]). Alors on constate que l'*A. agilis* appartient aux organismes »mésoaérophiles«, c. à d. que la plus grande accumulation n'a pas lieu dans le ménisque même, mais nettement à une certaine distance, ce qui veut dire que cet organisme, tout comme les spirilles, recherche une tension médiocre de l'oxygène. Toutefois, comme les spirilles s'accumuleraient encore un peu plus près du centre, il a un besoin d'oxygène un peu plus grand, de sorte que l'on peut dire que l'*A. agilis* se rapproche davantage du type des bactéries aérophiles. A ce point de vue les cultures pures se comportent de la même façon que les accumulations grossières.

L'*A. agilis* pouvant assimiler, tout comme le *Chroococcum*, un grand nombre de corps organiques, l'expérience d'accumulation pour cette espèce réussit encore avec plusieurs autres substances que les sucres mentionnés. C'est ainsi que j'ai parfois obtenu de bons résultats avec du sucre de canne et d'autres espèces de sucre en solution à 2%. Dans d'autres cas j'ai obtenu de belles pellicules de l'*A. agilis* avec ½% de lactate de calcium, ou ½% d'acétate de calcium. Avec 2% d'alcool comme source de carbone j'ai également obtenu de riches cultures d'*A. agilis*, mais, avec les sels d'acides organiques que je viens de nommer, leur développement était en retard sur celui dans des solutions de sucre. Avec des propionates et des succinates les résultats étaient moins satisfaisants; il est vrai que ces substances aussi sont énergiquement assimilées, mais alors le développement trop fort d'autres bactéries et aussi des amibes et des monades est gênant, parce que ces derniers organismes se nourrissent de préférence de l'*A. agilis* même.

L'eau du canal de Delft étant riche en substances organiques, il suffit parfois d'ajouter seulement un peu de K^2HPO^4 et de cultiver à 25°—28° pour y développer une mince pellicule d'*A. agilis*. Cela ne réussit toutefois pas toujours et dépend évidemment du rapport variable entre la substance azotée et celle sans azote de l'eau [2]).

---

1) Voir *Centralbl. f. Bact. etc.*, 14, 827, 1893.

2) L'eau du canal de Delft est renouvelée de temps en temps par de l'eau de la Meuse à Rotterdam. Sa matière organique oxydable correspond à environ 24 milligrammes de permanganate de potasse par litre.

Il était à prevoir que, par suite de la grande quantité de substances organiques contenues dans l'eau du canal, les organismes mésonitrophiles et même les polynitrophiles auraient une influence désavantageuse, et que les amibes, les monades et les infusoires contribueraient à donner à l'expérience un caractère beaucoup moins certain qu'à celle décrite au § 3 pour l'*A. chroococcum.*

La culture pure de l'*A. agilis* s'effectue sans difficultés particulières, si l'on prend soin de satisfaire aux conditions de cultures mentionnées. Le terrain solide suivant est p. ex. approprié:

Eau distillée	100
Agar	2
Glucose	2
K^2HPO^4	0,02.

Les autres aliments minéraux nécessaires se rencontrent en quantités suffisantes dans l'agar. Si l'on trace sur ce terrain des traits inoculatoires, provenant de pellicules de l'*A. agilis,* et que l'on cultive à 30° C., on voit déjà au bout de 24 heures de petites colonies qui continuent à croître pendant plusieurs jours. Il est vrai que les organismes mésonitrophiles, surtout une espèce très répandue dans l'eau du canal et qui donne naissance, sur le même terrain de culture, à de grandes colonies aqueuses, sont toujours en avance dans leur croissance et que le nombre des germes de l'*A. agilis* dont se développent des colonies est relativement petit, mais l'image microscopique de cette bactérie est tellement caractéristique qu'on la reconnaît immédiatement dans le chaos des différentes colonies.

Si dans le terrain de culture solide en question on remplace le glucose par ½% de propionate de calcium, et que l'on trace sur la plaque des traits ou stries d'*A. agilis,* on observe au bout de quelques jours, autour des colonies, des champs de diffusion assez étendus d'une substance colorante jaune verdâtre, rappelant celle des bactéries fluorescentes, et ce caractère aussi peut servir à reconnaître notre espèce.

Une fois qu'elle a été obtenue en culture pure, on peut la faire se développer sur les terrains nourriciers les plus divers. Dans un bouillon de viande à la gélatine sans substances étrangères, la croissance n'est que très médiocre et caractérisée par la formation d'alcali et du précipité blanc particulier dans le voisinage du trait inoculatoire, caractéristique pour les bactéries productrices d'alcali. Il ne se produit pas du tout de liquéfaction. Sur ce terrain de culture la mobilité est très grande. Elle est toutefois plus grande encore quand on cultive sur un bouillon de viande à l'agar.

Quand on ajoute du sucre au bouillon de viande à la gélatine, par exemple 2% de saccharose, il y a une faible formation de mucus, c. à d. que les bactéries se recouvrent, comme l'*A. chroococcum,* d'une paroi cellulaire épaisse, mucilagineuse.

Sur l'agar ou la gélose de commerce au glucose et à phosphate de potasse, mais sans autres aliments, comme sur tout terrain nourricier pauvre en azote, les vieilles cultures pures d'*A. agilis,* conservées dans des tubes à réaction, produisent une substance colorante très diffusible, capable de se diffuser dans l'agar auquel elle donne une coloration violet foncé. Il m'est impossible, pour le moment, de dire quelle est la fonction de ce pigment remarquable, qui par sa couleur ressemble au pigment non diffusible colorant en rouge-violet le genre *Chromatium* parmi les sulfobactéries.

A. agilis ne forme pas de spores, de sorte que cette bactérie ne résiste pas à la pasteurisation, comme nous l'avons déjà vu.

La coloration des cils a présenté dans mon laboratoire des difficultés telles que je me suis adressé encore une fois à M. le Prof. Zettnow, à Berlin, auquel j'ai envoyé des cultures de l'*A. agilis* pour lui demander son avis. Il a eu l'obligeance de me donner de très belles préparations, prouvant à l'évidence que les cils forment des faisceaux polaires, ainsi qu'on le reconnaît à la Fig. 6, qui est une reproduction d'une photographie faite d'après une de ses préparations. A ce propos il m'écrivit que »dans un bouillon de spirilles il n'y avait pas un seul individu qui n'eût été animé d'un mouvement des plus vifs ... D'après la nature de ce mouvement, régulier et ondulatoire, quoique vif, et ressemblant fort à celui des monadines, je m'attendais à trouver un ou plusieurs cils polaires, et cette prévision a été confirmée par les préparations dans un bouillon de spirilles, où la culture en pleine vigueur avait été tuée par la formaline. Ce résultat n'a toutefois pas été obtenu sans peine. Les 6 à 10 cils, fixés à un pôle ou aux deux pôles à la fois, s'appliquent d'ordinaire contre la paroi recouverte d'un ectoplasma très gluant, ce qui fait qu'ils semblent partir de la paroi latérale.« Au commencement j'ai également été induit en erreur et j'ai cru voir avec certitude des cils latéraux, mais un examen minutieux des préparations m'a donné la conviction que la manière de voir de M. Zettnow est exacte, au moins pour la grande majorité des individus.

L'accumulation de l'*A. agilis* dans une eau de canal contenant du sucre et du phosphate est le premier stade d'une flore et d'une faune excessivement riches, qui s'y développent quand on abandonne la culture à elle-même vers 18° C. Le liquide finit par devenir pâteux par suite d'un monde de microbes, composé, en dehors de l'*A. agilis* même, surtout de spirilles et d'autres bactéries, puis d'amibes et de monades et parfois aussi d'infusoires.

Il est certainement remarquable qu'un tel monde de microbes puisse prendre naissance en dehors de toute combinaison azotée.

7. *Courte diagnose du genre Azotobacter (Parachromatium) et des espèces qui en sont déjà connues.*

Il n'est pas inutile peut-être de donner, à propos de la planche qui accompagne ce travail, un court aperçu des caractères les plus importants des bactéries oligonitrophiles dont il vient d'être question.

Azotobacter (ou *Parachromatium).* Grosses bactéries, se présentant à l'état jeune comme de grands diplocoques ou de courts bâtonnets de 4 à 6 μ ou moins encore, parfois beaucoup plus grands, à contenu hyalin présentant souvent une vacuole, et munis d'une paroi mucilagineuse d'épaisseur très variable. Etats jeunes plus ou moins mobiles par suite de cils courts, isolés et polaires ou groupés en faisceaux polaires au nombre de 4 à 10, presque aussi longs que les bactéries elles-mêmes. Spores absentes. Organismes oligonitrophiles, c. à d. développant dans des solutions nutritives à source de carbone appropriée, mais très pauvre en combinaisons azotées, assimilant en symbiose avec certains autres microbes l'azote atmosphérique et par là capables de concourir. Sur ces propriétés peut être basée une méthode d'accumulation et de culture pure. Les cultures pures croissent sur les terrains nourriciers les plus divers, de préférence sur ceux pauvres en azote. Optimum de température pour la croissance non loin de 28° C.

On en connaît jusqu'ici les deux espèces suivantes:

1. *A. chroococcum.* Donne naissance à des membranes superficielles dans les accumulations sur de l'eau de conduite à 2% de mannite et 0,02% de K^2HPO^4, infectée par du terreau. Quelques individus seulement des cultures jeunes se meuvent sous l'action d'un seul cil polaire; la plupart sont immobiles. Les individus des membranes jeunes correspondent au diagnostic du genre; les vieilles sont constituées de microcoques de grosseur très variable, restant réunis en paquets comme des sarcines et garnis d'une paroi mucilagineuse. Ces états âgés sont souvent bruns ou noirs. Cette espèce peut oxyder de nombreux composés du carbone en formant de l'anhydride carbonique et de l'eau; elle est microaérophile. A côté de la forme principale j'ai rencontré deux variétés dans le terreau et dans l'eau de canal.

2. *A. agilis.* Très répandu dans l'eau du canal à Delft. S'obtient en cultures accumulatoires ou pures, d'une manière analogue à celle décrite pour l'espèce précédente. Très mobile par des faisceaux de cils polaires. Belles et grosses bactéries, très transparentes, rappelant des monadines; parfois avec paroi, protoplasma, noyau, granules et vacuoles nettement visibles. Croît sur les terrains les plus divers, de préférence sur de l'eau à l'agar pur avec 2% de glucose et 0,02 de K^2HPO^4. Peut engendrer une substance colorante, verte en présence de sels d'acides organiques, rouge en présence de sucre, qui se diffuse dans le terrain de culture. Ne liquéfie pas la gélatine.

Explication de la Planche.

Les cinq premières photographies ont été faites d'après nature, la sixième d'après une préparation colorée par M. Zettnow.

Figur 1. *Azotobacter chroococcum.* Culture jeune, âgée de 24 heures, sur de l'eau à 0,02% de phosphate de potassium, 2% d'agar et 2% de glucose. Quelques individus seulement sont mobiles. Grossissement 1000.

Fig. 2. *Azotobacter chroococcum.* Culture un peu plus âgée, sur H^2O — phosphate — mannite — agar, avec une bactérie acétifiante afin de faire voir les épaisses parois de mucus, dans lesquelles les bactéries du vinaigre ne peuvent pas pénétrer. Grossissement 500.

Fig. 3. *Azotobacter chroococcum.* Etat sarcinoïde brun foncé, sur H^2O — phosphate — mannite — agar. Les paquets de sarcines sont trop épais pour pouvoir être photographiés dans un même plan. Grossissement 1000.

Fig. 4. *Azotobacter chroococcum.* Etats d'involution sur H^2O — phosphate — glucose — agar, pris au bord d'une vieille colonie libre. Gouttelettes de graisse surtout visibles dans les petites cellules. Grossissement 800.

Fig. 5. *Azotobacter agilis.* Culture sur H^2O — phosphate — glucose — agar, âgée de deux jours. Dans le protoplasme on reconnaît le noyau ainsi que les vacuoles et les granules; dans quelques cellules en voie de segmentation on reconnaît le fuseau nucléaire. Grossissement 1000.

Fig. 6. *Azotobacter agilis.* Coloration des cils; photographie d'après une préparation de M. Zettnow, à Berlin. Cils groupés pour la plupart en faisceaux polaires. Grossissement 1000.

Fig. 1.

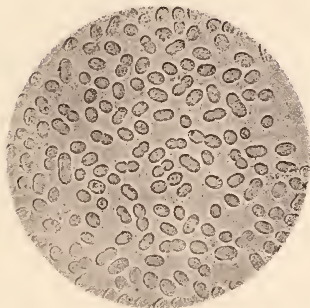


Fig. 2.

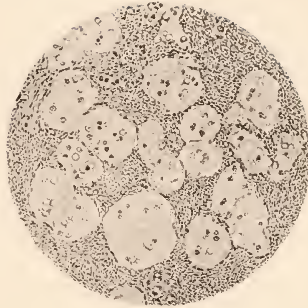


Fig. 3.

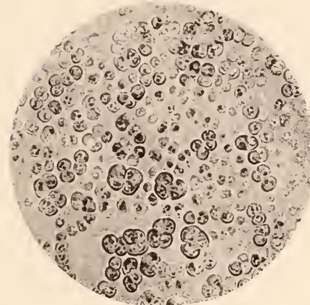


Fig. 4.

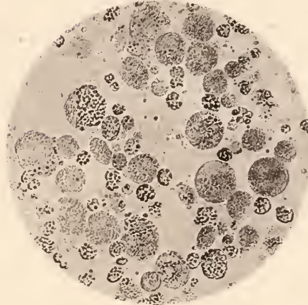


Fig. 5.

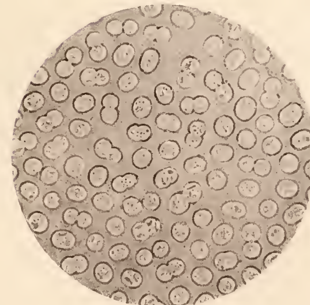


Fig. 6.



Fig. 1—4 Parachromatium (Azotobacter) chroococcum. Fig. 5—6 P. agilis.

Further researches concerning oligonitropholous microbes.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. IV, 1902, p. 5—9. — Verscheen onder den titel »Verdere onderzoekingen over oligonitrophile Mikroben« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis- en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel X, 1902, blz. 8—13.

In my first paper on oligonitrophilous microbes[1]) I still left the question unanswered after the forms which develop in the light, in nutrient liquids, which only contain traces of nitrogen compounds, and whose nutrition with carbon can only be effected from the carbonic acid of the air.

The experiments to answer this question were made as follows. Large flasks were plugged with cotton wool or filtering paper, so that the air has free access, or closed in such a way that the air could be renewed, and that, at each renewing, it must pass through strong sulphuric acid in order to be deprived of the nitrogen-compounds. These flasks had been half filled with

100 Tap- or distilled water

0.02 K^2HPO^4

and infected with a not too slight quantity of garden-soil, e. g. 1 to 2 grs. per liter[2]).

They were placed in winter at a window on the south, in spring and in summer on the north-west, and in the beginning they were now and then shaken, in order to sink the floating film of calciumphosphate, which forms at the surface.

As the rate of nitrogen and carbon compounds is too slight to cause any appreciable development of colourless microbes, no further cloudiness results, but that of the easily precipitating phosphate. But in winter after six to eight, in summer after four to five weeks, *a characteristic flora develops consisting of some species of Cyanophyceae*, which, once become visible, can promptly give rise to a deep bluish-green colouring of the liquid. In the beginning these Cyanophyceae are seen to develop as free colonies at the sides of the flask, later there also appear floating films, which latter consist chiefly of *Anabaena*, while among the colonies growing on the glass-wall, not only the large flat colonies of *Anabaena*, but likewise the characteristic, but rarer bluish-grey slimy lumps of *Nostoc paludosum* are most striking. A

---

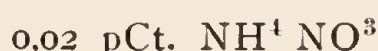
[1]) These Proceedings of March 30, 1901.

[2]) The Delft tap-water contains a present 0.42 mG. nitrogen per L., the garden-soil used 0.56 pCt. nitrogen (analyses of Mr. A. v. Delden); but this nitrogen can only for a minimal portion (as ammonia and nitrate-nitrogen) be assimilated by microbes. The oligonitrophili themselves posses the specific faculty of feeding on the nitrogen from the atmosphere.

third, very intensely coloured species, which is nearly as common, I determined as *Nostoc sphaericum*[1]).

Motile Cyanophyceae, such as *Oscillaria*, do not result under these conditions, or only in much smaller numbers than those mentioned; probably for them the proportion of organic substances in the said nutrient liquids is still too large and that of nitrogen compounds perhaps too slight. I have also found that *Oscillaria* is microaërophilous[2]) in the dark, so that, at the places fit for its development, at least temporary anaërobiosis should be possible, which is not the case in my experiment.

Chlorophyceae, especially *Chlorococcum* and *Chlorella* are, as might be expected, not wholly absent in these cultures; but their number is so small that they are without any influence on their external character. This fact is the more remarkable because, if to the culture fluid is added



0,02 pCt. $NH^4 NO^3$

already after a shorter time than the above mentioned, a dense film of Chlorophyceae, in which *Chlorococcum infusionum* is the principal species, grows rapidly on the surface. Only when the nitrogen-compounds added to it have been quite consumed, the green film grows darker, as then again flakes of *Cyanophyceae*, in particular of *Anabaena*, begin to form.

The experiments have essentially the same course when the tap-water-phosphate flasks are not infected with garden-soil, but with a small flake taken from a previous culture of Cyanophyceae. Here I saw however, in some cases appear *Anabaena* only, which under these conditions of culture evidently supplanted the other Cyanophyceae.

If in my experiments I use Delft canal-water, instead of tap-water, and omit, the infection with garden-soil, the process is somewhat different. First a rich light-brown culture of *Diatomaceae* takes rise, in which here and there colonies are seen of Chlorophyceae belonging to the genera *Raphidium*, *Scenedesmus*, *Chlorella* and *Chlorococcum*, but without their multiplying sufficiently to alter the brown colour of the culture. After 8 to 9 weeks however, the colour at once grows darker by the then occurring increase of the Cyanophyceae, which increase continues a long time evidently as long as there is a sufficient quantity of kalium phosphate and other mineral food.

I think the result of this last experiment should be explained as follows. Canal-water contains a greater amount of organic substances than the tap-water cultures; as long as these substances are present the Diatoms are prevailing; they use these substances for their carbon-nutrition, together with the carbonic acid from the air, and at the same time assimilate the nitrogen-compounds. When these are consumed the Cyanophyceae appear.

That the Diatoms can in fact utilise a fairly high rate of organic substances, is well known to the students of that group. The following experiment which, to my knowledge, has not yet been described, proves that the Diatoms are the very

---

[1]) Not all the species of Cyanophyceae obtained could be determined. Some of them I think have not been described.

[2]) It is macroaërophilous in the light.

coloured microbes, which can, if not assimilate, at least tolerate without injury the full rate of organic matter and of nitrate-.and ammonia-nitrogen of fertile garden-soil.

A high glasscylinder is filled for one half with garden-soil, for the other with pure water. After shaking the thus obtained mud is allowed to stand at a sunny window. After some days or weeks, according to season and temperature, one sees at the illumined side of the glass a deep brown film appear, consisting of the Diatoms present in the garden-soil, which slowly creep towards the light. This film increases some months by the multiplication of the Diatoms, but finally there appear in it large green spots of various lower Chlorophyceae, whose propagation becomes only vigorous, when the Diatoms and other microbes (such as bacteria and monads) have for the greater part used the assimilable organic substances and converted them into unassimilable material. Cyanophyceae do not grow under these circumstances, this being prevented by the abundance of nitrogen-compounds in the garden-soil.

Though it is certain, that the flora of Cyanophyceae in my tap- and canal-water experiments only develops with an extremely small porportion of organic matter in the food, I still consider this proportion to be of an essential signification for the experiment. I have already convinced myself that at as complete an absence as possible of organic substances, the development of the flora follows quite a different course, but I am as yet unable thereabout to impart any decisive results.

The experiment now described, is not quite new as to its principle. In another form it was already performed in 1892 by Schlösing fils and Laurent[1]), not however with a culture liquid, but with a solid sand-soil and under conditions much more complicated than mine. Noteworthy is that also these investigators, cultivating in the light under the exclusion of all compounds of nitrogen, obtained Cyanophyceae belonging to the same or almost the same genera as those resulting from my experiments. They have moreover come to the result that by these Cyanophyceae free nitrogen was assimilated in a slight but distinctly observable quantity, and though they have not completely proved this assertion, as their cultures must have contained other organisms too, e.g. many bacteria, basing also on my own experiences I take their view to be correct.

My experiment throws some light on the two followingobservations. Graebner[2]) observed that fresh sandy grounds, which are changing into moors, cover in the beginning with a flora of Cyanophyceae; and Treub[3]), when visiting the isle of Krakatau after its destruction, found that the new flora which first developed on the volconic ashes, likewise consisted of Cyanophyceae, of which he in particular mentions *Lingbya verbeekiana* and *L. minutissima*. Both, the said heathsand and the ashes of Krakatau, have no doubt been extremely poor in nitrogen-compounds.

If absolutely rejecting the theory of spontaneous generation, it might be assumed that certain Cyanophyceae, carried over from the universe by meteorites,

---

[1]) Fixation de l'Azote libre par les plantes. Ann. de l'Institut Pasteur T. 6 pag. 832, 1892. The authors make special mention of *Nostok punctiforme, N. minutum* and *Cylindrospermum majus.*

[2]) Studien über die norddeutsche Heide. Bot. Jahrbücher. Bd. 20, 1891.

[3]) Notice sur la nouvelle flore de Krakatau. Ann. d. Jard. Bot. de Buitenzorg. T. 7, 1888.

have been the first organisms which peopled the earth, as no other living beings are known which, like the Cyanophyceae, are able to build up their organic constituents from carbonic acid and atmospheric nitrogen.

Once asquainted with the culture conditions of the Cyanophyceae I could easily obtain pure cultures on a solid medium. I therefore used as well silica as agar which by long washing with tap-water had been freed from the soluble organic substances, but saturated with the constituents of the tap-water. Plates of this agar, to which nothing else had been added but 0.02 pCt. $K^2 H P O^4$, and on which tap-water cultures of *Anabaena* had been sown out, were placed in the light of a window on the north, and after 10 to 14 days already produced extensive *Anabaena*-colonies free from bacteria. If the plates are not thoroughly washed *Anabaena* does not grow at all on them.

With plates prepared of silica instead of agar I obtained the same results.

The washing of the plates is effected by placing them, after solidification in the glass-box, into a large beaker with water, which is continually renewed during a few days by a current from the tap.

Then kalium phosphate is introduced into the plates by pouring over them a solution of this salt in distilled or tap-water, which solution is renewed a few times. Finally the superfluous water adhering to the plates is removed by heating the glass-box for a short time over a Bunsen-flame.

Oscillaria and allied species do not grow on the thus prepared media, they even die on it already after some days. Mr. A. van Delden, however, has succeeded in my laboratory to obtain a pure culture on a solid medium of such a motile form related to *Oscillaria*.

This culture necessitated two other precautions. *First* the organic substance had to be removed from the agar more completely than is wanted for *Anabaena*, and therefore it proved necessary to wash with a current of distilled water. *Second*, the addition of a little of a nitrogen compound, e.g. a trace of ammonium-nitrate proved necessary, or at least favorable. On such agar the growth of the organism remains however very scanty, and, as besides many species of chlorophyceae can develop under these circumstances, we leave herewith the group of oligonitrophili, whose specific faculty consists in their being able to live on the nitrogen from the air, in opposition to the Diatoms and the Chlorophyceae. Hence this faculty seems also peculiar to a part only of the Cyanophyceae.

The question put at the head of this paper should thus be answered as follows.

In culture liquids, containing besides the mineral constituents of the food, a slight quantity of garden-soil, but to which no other nitrogen-compounds have been added, develop, under the influence of the light and the carbonic acid from the air, various species of *Cyanophyceae*, chiefly belonging to the genera *Nostoc* and *Anabaena*. Germs of these are very numerous in garden-soil. The presence of nitrogen-compounds prevents the development of the *Cyanophyceae*, but furthers that of certain *Chlorophyceae* and *Diatomaceae*.

Photobacteria as a reactive in the investigation of the chlorophyll-function.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. IV, 1901, p. 45—49. — Verscheen onder den titel »Lichtbacteriën als reaktief bij het onderzoek der chlorophylfunctie« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel X, 1901, blz. 69—74.

If in a mortar leaves of some neutrally reacting plant, e. g. of white clover are crushed, diluted with destilled water, and filtered, a green filtrate is obtained, in which are found that portion of the living protoplasm which is soluble in water, and many chlorophyllgranules which give the filtrate a green colour.

If this green liquid is mixed with a culture of phosphorescent bacteria in fishbroth with 3 pCt common salt, or with sea-water [1]) rendered phosphorescent by a »luminous bouillon«, and if this mixture is filled into a test-tube or stoppered bottle, the liquid becomes dark as soon as the oxygen has been used by the physiological processes of the phosphorescent bacteria and of the living protoplasm of the clover-leaves in the filtrate.

If the dark liquid is exposed to light, it is evident that the chlorophyll and the living protoplasm have not become inactive by the said treatment, for, by production of oxygen, they again cause the luminosity of the bacteria. If the plant-juice is fresh and the bottle is placed for a minute or longer in the full sun, then so much oxygen is formed, that the bacteria, transferred to the dark can continue phosphorescing for some minutes.

This experiment is of an extreme sensibility, for even the lighting of a match is sufficient, after part of a second already, to produce a distinct phosphorescence which, of course, can only be observed when by remaining long enough in the dark, the eye has become sensible to feeble light.

If the liquid is left to stand for some hours, either as such or after mixing with the phosphorescent culture, the power of decomposing carbonic acid gets quite lost. Evidently the presence of living protoplasm is necessary for it. Concequently, Friedel's [2]) experiment, wherein clear, filtered juice of squeezed spinage-leaves, mixed with powdered leaves of the plant, dried at 100° C., causes decomposition of carbonic acid, does not prove, as Friedel thinks, that the function of chlorophyll reposes on the action of enzymes, but on the fact, that the portion of the protoplasm

[1]) By »sea-water« is meant tap-water with 3 pCt. Cl Na·

[2]) J. Friedel, l'Assimilation chlorophyllienne réalisée en dehors de l'organisme vivant. Comptes rendus T. 132, pag. 1138, 6 Mai 1901.

concerned in the process, occurs in the liquid state and is not solid, — hence, a new argument for the more and more prevailing opinion, that the living protoplasm is, if not quite, at least partly liquid. That the juice can be precipitated with alcohol, without the precipitate becoming inactive, proves nothing for the enzyme-hypothesis, as in many other cases the living protoplasm is proof against the action of alcohol.

If it be thought desirable to use the name of »protoplasm« only for the mixture of the living matter such as it occurs in the cell, and to connect with that term the idea of a special structure, I can quite well share this view, and will allow that, in this case, the decomposition of the carbonic acid is brought about by something else but »the protoplasm«, namely by a portion of it. To this portion, or rather, to this particular constituent of the protoplasm, the name of »oxybiophores« or »oxy-pangens« might be given, in accordance with the theory of biophores or pangenesis. With what has always been understood by enzymes, the properties of the biophores do not coincide but, of course, they do with those of the protoplasm itself [1]).

With crushed algae I could also perform the above experiment, but the secretion of oxygen was much slighter than with the sap of the examined land-plants.

On the other hand, algae which have not been crushed, whether enclosed in a mixture of culture-gelatin and luminous bacteria, or simply in sea water rendered luminous by phosphorescent bouillon, are very well fit to study the secretion of oxygen in the light and its relation to the colour of the light.

Some years hence, Prof. Kamerlingh Onnes, at Leiden, had the kindness to enable me to make an investigation thereabout in his laboratory. Our experiment was conducted as follows.

Between two glass-plates was enclosed fish-bouillon-gelatin diluted with sea-water, and thus containing 3 pCt. Cl Na, which by a great number of phosphorescent bacteria *(Photobacter phosphorescens)*, mixed with it, was highly luminous at sufficient access of oxygen. In the middle of the gelatin I had placed, before the solidification, a broad stripe of a sea-*Ulva*.

In the dark the gelatin quickly closes its luminosity, the glassplates rendering access of air impossible. When exposed to the light, the *Ulva* produces oxygen through the decomposition of carbonic acid, and a local spot of light appears, which may be caused to come and to vanish at will as often as desired.

This apparatus was set up in a simple camera and could be locally illumined by withdrawing a slide. When the slide was closed the camera was quite dark, by which the eye of the observer became sensible to the light. Prof. Onnes himself supplied spectral colours of known refrangebility, taken from the spectrum of an electric arc-light, and projected them on the *Ulva* in the gelatin. By me was then observed what coloured lights were well, and what were not able to cause the decomposition of carbonic acid. The result was the following: Only red light decomposes carbonic acid, for only in it the phosphorescent bacteria emit a strong light; the maximum of decomposition was found near the chief absorption-band of the chlorophyll-pigment, situated between B and C, and this maximum coincides about with C

[1]) This observation holds also good with regard to Buchner's »alcohol-enzyme«, of which the active agent consists in »alcohol-biophores«.

itself, certainly it was somewhat out of the middle of B—C. Decomposition of carbonic acid in other coloured lights could not be detected.

If the Chlorophycee was replaced by a Rhodophycee, which I determined as *Porphyra vulgaris*, and which, like the *Ulva*, is common on the stone piers at Scheveningen, the process was nearly the same, but with this difference that the maximum of decomposition does not coincide with C but lies quite in the orange.

As the chromatophores of *Porphyra*, besides the chlorophyll-pigment, contain a red pigment soluble in water, and of which two chief absorption-bands are situated in the yellow, it is obvious that the maximum of carbonic-acid decomposition is in this case determined by the co-operation of the coloured rays which both pigments by preference absorb.

Our results, accordingly, correspond in the main point with those obtained by Prof. Engelmann[1]), by his method based on the motion of bacteria, with this difference that the production of oxygen in two other absorption-bands, situated in the blue, as described by him, could not be observed by us.

In opposition to the sea-algae and likewise to the crushed leaves of landplants, whole leaves of the latter, immersed in luminous fishbouillon, or in gelatin mixed with phosphorescent bacteria, do not distinctly, or only for a very short time, produce oxygen, when they are illumined after being freed from the air enclosed in their tissues.

In the following way, however, the experiments with them went very satisfactorily.

Instead of enclosing the leaf *in* the strongly phosphorescent gelatin it is simply laid *on* the surface, and firmly pressed to it by means of a solid glass-plate.

Kept in the dark, after some time all the oxygen originally enclosed in the tissues of the leaf is utilised by the phosphorescent bacteria and everything under the glass-plate grows dark. If now the leaf is illumined, oxygen is formed, and when transferred to the dark, the bacteria will be seen to continue emitting light for some time[2]).

These experiments confirm the results obtained by Stahl[3]), which demonstrate that the stomata are the ways by which the gases enter and leave the leaf. For when suitable leaves are selected with about an equal number of stomata on both surfaces, and examined after our method, it appears to be all the same, whether the leaf is pressed with its under or upper side against the gelatin, in both cases a luminous spot of the shape of the leaf appears, after illumination. If, on the other hand, the stomata are only, or for the greater part, at the under surface, and the leaf is pressed with its *upper* surface on the gelatin, thus with its underside against the glass-plate, then the oxygen accumulates between the latter and the leaf, and does not, or only partly pass through the lamina but, reaching the gelatin along the margin of the leaf, a luminous *line* following this margin is produced.

If such a leaf is illumined after being pressed with its *under* surface on the ge-

[1]) Botanische Zeitung. 1883 pag. 1, 1884 pag. 81.

[2]) For the right performance of this experiment some practice is required as the layers of air, adhering to the leaves, and which are greatly different at the upper and under surface, influence largely on the course of the process.

[3]) Botan. Zeitung. 1894 pag. 117, 1897 pag. 71.

latin, the oxygen issuing from the stomata directly comes into contact with the gelatin, and a luminous *spot* appears shaped like the leaf.

In performing this experiment it is advisable to cut one and the same leave into two halves and press at once both parts on the gelatin, one with the upper- the other with the underside.

The process can, however, become very complicated by the closing of the stomata, which are extremely sensitive to the contact of the salt-containing culture-gelatin, and evidently also to the absence of oxygen in their surrounding, when kept in the dark.

The fact that nyctitropic leaves evaporate the most vigorously at that side, which is covered during the night, has been confirmed by the photobacteria-method respecting the secretion of oxygen. So, the clover-leaf closes at night by putting the upper surfaces of the leaflets against one another: hence these surfaces must exhibit a more energetic secretion of water-vapour, and in the light, of oxygen, then the under surfaces, which has been confirmed by the experiment.

For *Robinia pseud-acacia,* where at night the under surfaces cover each other, the most vigorous secretion of oxygen is to be expected in the light from the underside, which is likewise confirmed by the experiment. But with *Robinia* the difference is less considerable than with clover.

Ueber die sexuelle Generation von Cynips Kollari.

Marcellia, Riv. int. di Cecid. v. I, an. 1902, fasc. I-II, Padova, p. 13—20.

Als ich vor einigen Jahren fand[1]), dass die Knopperwespe *(Cynips calicis)* von *Quercus pedunculata* eine zweigeschlechtliche Generation *(Andricus cerri)* erzeugt, welche in kleinen Gallen an den Staubbeuteln von *Quercus cerris* lebt, drängte sich wie von selbst die Frage auf, wie sich wohl die übrigen Arten der Gattung *Cynips* s. s. verhalten möchten. Könnte auch dabei vielleicht zu gleicher Zeit Heterogenesis und Heterö̈cie combiniert vorkommen? Besonders *Cynips kollari,* — ausser *C. calicis* die einzige Niederländische echte Cynipsart, — forderte zu neuen Untersuchungen auf. Zwar hatte ich früher, auf Grund eines scheinbar überzeugenden Versuchsergebnisses, die Meinung ausgesprochen[2]), diese Art sollte sich nur parthenogenetisch fortpflanzen, doch war ich darüber später wieder in Zweifel geraten, weil ich im Laufe der Jahre sehr viele Male die Eiablage bei der Kollariwespe auf *Quercus pedunculata* vergebens zu beobachten versucht hatte. Zwei Umstände haben mich bei dieser Untersuchung lange von der definitiven Entscheidung zurückgehalten, nämlich, die Lage des Eies, woraus *C. kollari* entsteht, und die Verbreitung dieses Tieres. In ersterer Beziehung erlaube ich mir folgende Bemerkung.

Bevor ich *Andricus cerri* entdeckt hatte, war ich überzeugt, dass jene Lage des Eies, darauf zu deuten schien, dass nur die Kollariwespe selbst bei der Ablage in Bezug kommen könnte, weil sich leicht nachweisen lässt, dass der Blattstiel unterhalb der *meisten* (nicht aller) Stücke der Kollarigalle angebohrt ist. Hiervon konnte ich anfangs den Nutzen nicht verstehen, wenn eine Sommergeneration dabei arbeiten sollte. Denn es erschien mir, dass es doch vernünftiger wäre für eine zart gebaute Gallwespe, ihr Ei sofort in die junge Achselknospe, aus deren Basis später die Kollarigalle entsteht, zu deponieren, wie sich unten auf den Blattstiel des zugehörigen Tragblattes zu setzen, diesen zu durchbohren um erst dann jene Achselknospe zu erreichen. Von dieser Auffassung wurde ich jedoch zurückgebracht durch das Studium der Entwicklungsgeschichte der Calicisgalle, wobei ich die sehr eigentümliche Wachstumsfähigkeit der basalen Teile der wachsenden Eichel kennen lernte. Mit diesem basalen Teile stimmt aber die Knospenbasis, woraus die Kollarigalle sich entwickelt, anatomisch und auch morphologisch überein. Das Ei eben auf diese schwierig erreichbare Stelle zu bringen, konnte unmöglich sicherer geschehen als wie es tatsäch-

[1]) Zur la Cécidiogénèse et la génération alternante chez le *Cynips calicis.* Observations sur la galle de l'*Andricus circulans.* Archives Neêrlandaises des Sciences exactes et naturelles, t. 30, p. 387, 1897.

[2]) Ueber die ersten Entwicklungsphasen einiger Cynipidengallen, p. 136, — Amsterdam 1882.

lich auch meistens geschieht, nämlich dadurch, dass die Wespe den Blattstiel von unten nach oben durchbohrt, den Eikörper mit jener Basis in Contact bringt, und den Eistiel in der Dicke des Blattstiels, beim Einziehen der Legeröhre zurück lässt, so wie ich das l. c. beschrieben und abgebildet habe, wenn auch nicht ganz genau in Bezug auf die Gestalt des Eies, und, wie ich nun zeigen werde, völlig unbekannt mit der wahren Urheberin.

Der zweite Umstand warum ich, nachdem ich *Andricus cerri* schon genau kennen gelernt hatte, doch immer noch annahm, dass *C. kollari* sich nur durch Parthenogenesis fortpflanzt und sehr schwierig zur Eiablage zu bringen ist, war die, auf der Verbreitung von *C. kollari* gegründeten Meinung, dass diese Art überall wo *Quercus pedunculata* vorkommt ebenfalls angetroffen werden kann, sodass, wenn eine zweigeschlechtliche Generation existieren sollte, diese doch auch wohl auf jenem Baume vorkommen müsste, und ich suchte dieselbe nach Analogie mit Cerri in den Staubbeuteln. Wäre diese Ansicht zutreffend, so müsste Kollari, welche im September und October ausfliegt, ihre Eier in die Winterknospen mit männlichen Blütenkätzchen von *Q. pedunculata* ablegen, und darüber habe ich dann wieder viele Versuche angestellt. Alles jedoch vergebens, niemals konnte ich eine Wespe veranlassen sich ruhig auf eine Knospe zu setzen, die Tiere liefen in den Gazenetzen immer der Lichtquelle zu, durch alle Teile der Eichenzweige mehr abgestossen, wie angezogen.

Ich kam dann schliesslich auf den glücklichen Gedanken einige Wespen mit Zweigen von *Quercus cerris* einzusperren und hatte sofort Erfolg: Die Tiere wurden auf einmal ruhig, sie hatten offenbar ihren Lebenszweck erreicht. Schatten oder Sonne waren nunmehr gleichgültig, jede Wespe suchte eine Knospe, stach die Legeröhre hinein und innerhalb einer Stunde hatte ich die Eiablage beobachtet. Alles war einfach und klar; die lange gesuchte Lösung des Rätsels war gefunden.

So stand die Sache im October 1898; offenbar musste nun eine sehr frühzeitig auf *Quercus cerris* sich entwickelnde Galle entgegen gesehen werden. Welche Galle sollte dieses aber wohl sein können? Mir waren in Niederland nur zwei Cynipidengallen auf *Q. cerris* bekannt, nämlich *Andricus cerri* und *A. circulans*. Sollte es vielleicht doch die letztere werden? Für die Circulanswespe hatte ich aber beobachtet, dass sie die Knospen von *Q. cerris* selbst ansticht, und aus solchen Knospen hatte ich, allerdings nach Versuchen, welche im Freien und fern von meinem Wohnorte ausgeführt waren, im nächsten Jahre wieder Circulansgallen erhalten. Diese Erfahrungen veranlassten, dass ich auf das Resultat sehr gespannt war. Lange brauchte ich darauf nicht zu warten: Als ich im Februar 1899 einige meiner mit Kollarieiern belegten Cerrisknospen öffnete, fand ich darin die kleinen Gallengruppen, welche für Circulans so charakteristisch sind, und mit deren Entwicklung ich sehr gut bekannt war. Meine Versuchsbäume standen im Laboratoriumsgarten zu Delft, ich hatte dieselben während des Winters fortwährend beobachtet, hier war ein Fehler unmöglich. Im April brachen aus den Knospen die schönen, anfangs roten Circulansgallen in grosser Anzahl hervor, und 12. Mai 1899 flogen die ersten ♂ und ♀ von *Andricus circulans*, als legitime Kinder der Kollarimutter hinaus.

Obschon ich von daran durchaus überzeugt bin, dass meine frühere, in Bezug auf die direkte Fortpflanzung von *A. circulans* ausgesprochene Ansicht nicht richtig sein kann, muss ich doch bemerken, dass meine Beobachtung, dass *A. circulans* Eier in die Knospen von *Q. cerris* ablegt, wenn auch vielleicht nur ausnahmsweise, ganz

sicher richtig ist. Ich habe ein solches Tier während seiner Arbeit auf einer Cerrisknospe mitsammt dem Zweige in Chloroform getötet und bewahre das Object in der Laboratoriumssammlung, wo jeder es sehen kann. Ich glaube nun aber, dass solche Eier verloren sind, weil *C. kollari* sich nicht aus den Cerrisknospen entwickeln kann.

Dass ich dann weiter aus solchen Knospen nach Jahresfrist Circulansgallen erhalten habe, muss auf einen Zufall beruht haben, offenbar sind die Knospen im Herbste 1897 von Kollariwespen besucht. Auf den ersten Blick mag dieses unglaublich erscheinen; das Folgende macht die Sache jedoch annehmlicher. Im Sommer des Jahres 1898 hat mein Versuchsbaum eine wahrhaft unzählbare Menge von Circulansgallen getragen. Sie waren darauf beinahe an jedem Zweige zu finden. Diese Tatsache wird erklärlich aus der grossen Menge von Kollarigallen, welche in 1897 eben zu Rheden, wo die Versuche ausgeführt wurden, vorkamen. Alle die tausenden, damals dort schwärmenden Kollariwespen, welche jede c. 800 Eier enthalten, sind für ihre Eiablage auf eine sehr geringe Zahl von Cerrisbäumen angewiesen, ich kenne in jener Gegend nur fünf Exemplare. Es ist deshalb nicht all zu verwunderlich, dass meine vorher durch Circulanswespen angestochene Knospen später noch einmal durch Kollari besucht wurden.

Was die Zukunft nun übrigens in Bezug auf die Gewohnheiten von *A. circulans* lehren wird, feststeht, dass dieses Tier die sexuelle Generation zu *Cynips kollari* ist.

Im Herbst 1900 habe ich den Versuch mit *C. kollari* wiederholt, mehrere Kollariwespen während ihrer Arbeit an abgeschnittenen Cerriszweigen mitsammt diesen in Chloroform geworfen und in Alkohol aufbewahrt. Herr A. van Delden, Assistent am Bacteriologischen Laboratorium, hat davon schöne Photographien angefertigt, und er ist bereit, Abdrücke oder Diapositive für das Sciopticon abzugeben. Ich erwähne dieses, weil *C. kollari* als grösste einheimische Cynipide, wegen der Gleichheit mit *C. tinctoria,* und als besonders auffallend und bekannt durch ihre Galle, ein empfehlenswertes Object für den Unterricht ist.

Im October 1901 habe ich die Versuche abermals wiederholt, und nun, während ich dieses schreibe, im Februar 1902, sehe ich wieder eine neue Ernte von Circulans auf meinen Cerrisbäumen in Entwicklung.

Es ist mir dagegen bisher noch nicht gelungen, *Andricus circulans* auf *Q. pedunculata* zur Eiablage zu bringen, doch zweifle ich nicht daran, dass ich dieses, in diesem oder in einem der nächst folgenden Jahre erreichen werde, weil ich gegenwärtig im Laboratoriumsgarten eine gemischte Anpflanzung von *Q. cerris* und *Q. pedunculata* habe, welche schon im Jahre 1901 eine reiche Ernte von beiden Gallen getragen hat, und zwar spontan, so dass Circulans in meinen Garten offenbar zur Eiablage gekommen ist.

Dass die Versuche mit den eingezwingerten Circulanswespen bisher misslungen sind, erkläre ich aus den eigentümlichen Gewohnheiten dieser Wespe, welche ganz verschieden sind von denen von Cerri. Letztere Art ist ein sehr zartes Tierchen, so zu sagen ein Sonnenstäubchen, wofür es wichtig sein muss, sofort nach dem Ausschlüpfen zu copulieren, was auch wirklich stattfindet, und wenn dann eine junge Eichel gefunden ist, ohne Verweil zur Eiablage fort zu schreiten, weil die Chancen für Vernichtung hier ausserordentlich gross sind, und der leiseste Wind das winzige Tier fern von dem Eichenwalde würde wegführen können.

Andricus circulans dagegen ist eine viel kräftiger gebaute Wespe, welche so

sehr von voriger Art in ihrem Körperbau abweicht, dass man davon gut eine besondere Gattung machen könnte. Das Tier ist gewandt beim Fliegen und schreitet nach dem Ausschlüpfen durchaus nicht sofort zur Copulation über. Diese habe ich bisher überhaupt nicht beobachtet, obschon ich hunderte ♂ und ♀ zusammengebracht habe. Ich vermute darum, dass es, bevor zu copulieren, einige Zeit herumschwärmt und vielleicht weit fortfliegt. Die Verbreitung der Kollarigalle ist mit dieser Ansicht in guter Uebereinstimmung, denn eine Abhängigkeit dieser Verbreitung mit derjenigen von *Q. cerris* habe ich erst dann bemerkt, als ich sicher war, dass dieselbe tatsächlich besteht. So gross kann die Entfernung sein zwischen dem Cerrisbaume, welche die Circulanswespe hervorbrachte und dem Pedunculatabaum, worauf sie zur Eiablage kommt, dass eine Beziehung zwischen denselben uns zunächst völlig entgeht. Es ist auch auffallend, dass in meinem Garten die Kollarigallen vorzugsweise an drei kleinen Bäumen von *Q. pubescens* var. *villosa* entstehen, welche erst im Beginn Juni sprossen, das ist beinahe 14 Tage später als die Ausschlüpfzeit von *A. circulans,* was ebenfalls auf eine längere Schwärmzeit hindeutet.

Aus der nunmehr feststehenden heteröcischen Heterogenesis von zwei Arten der Gattung *Cynips* s. s., kann, auf Grund der Lebensweise der übrigen Arten, der Schluss gezogen werden, dass auch diese jedenfalls eine sexuelle Generation besitzen müssen, und, dass viele davon ebenfalls heteröcisch sein dürften. Durch diese Theorie eröffnet sich eine Reihe von Fragen in Bezug auf die Zusammengehörigkeit der zweigeschlechtlichen Arten von *Q. cerris* mit agamen Generationen von *Q. pedunculata, Q. sessiliflora* und *Q. pubescens,* wovon die sexuellen Generationen bisher unbekannt geblieben sind.

Zunächst ist es auffallend, wie gering die Zahl der bekannten agamen Formen von *Q. cerris* ist, wovon die zugehörigen sexuellen sicher auf derselben Baumart vorkommen. Eigentlich dürften nur *Chilaspis nitida* ♀ mit *Ch. löwi* und *Dryocosmus cerriphilus* ♀ mit *Dr. nervosus* ♂♀ als genügend wahrscheinlich in dieser Beziehung zu betrachten sein. Dagegen sind die zugehörigen sexuellen Formen von allen anderen agamen Cerriscynipiden, für soweit ich weiss, unbekannt. Dieses gilt z. B., wenn nur die besser bekannten in Betracht gezogen werden, für die agamen *cerricola, glandium, lanuginosus, minutulus, macroptera* und *saltans.* Also sechs Arten. Dem gegenüber stehen nicht weniger wie 14 sexuelle Arten von *Q. cerris,* wovon die zugehörigen agamen Formen unbekannt sind, nämlich: *adleri, aestivalis, beijerincki, burgundus, cerriphilus, cerrifloralis, crispator, glandiformis, grossulariae, multiplicatus, politus, schrökingeri, singulus* und *vindobonensis.*

Angenommen, dass von diesen 14 sexuellen Formen sechs zu den oben genannten agamen gehören, dann bleiben noch jedenfalls acht Arten übrig, wovon es ganz unwahrscheinlich ist, dass sie zu acht noch nicht entdeckten Agamen von *Q. cerris* gehören sollten. Es ist im Gegenteil viel wahrscheinlicher, dass in den nächsten Jahren die Zahl der neu zu entdeckenden sexuellen Formen von *Q. cerris,* welche gewöhnlich klein, vergänglich und versteckt sind; noch beträchtlicher sein wird, wie diejenige der meistens viel leichter auffindbaren Agamen.

Betrachten wir nun die Verhältnisse bei den auf *Q. pedunculata, Q. sessiliflora* und *Q. pubescens* lebenden Arten so ist es nicht weniger auffallend, dass hier das Verhält-

nis geradezu umgekehrt ist, das heisst, dass hier ein grosser »Ueberschuss« von agamen, zu *Cynips* s. s. gehörigen Formen vorherrscht [1]). So sind unbekannt die sexuellen Generationen von: *ambigua, amblycera, argentea, aries, caliciformis, caput-medusae, conglomerata, conifica, coriaria, coronaria, corruptrix, galeata, glutinosa, hartigi, hungarica, kiefferi, lignicola, mayri, mediterranea, mitrata, panteli, polycera, stefanii, tinctoria, tomentosa, truncicola.* Die neuen Erfahrungen in Bezug auf Calicis und Kollari legen es nun nahe anzunehmen, dass einige dieser Agamen die sieben nicht unterzubringenden Cerrisformen zur sexuellen Generation haben dürften, während für die übrigen die sexuellen Generationen noch zu entdecken und wohl ebenfalls auf *Q. cerris* zu suchen sind.

Es wäre übereilt, die hier vorgetragene Ansicht noch weiter in Besonderheiten auszuarbeiten, obschon sie zu einigen Arbeitshypothesen Veranlassung gibt, welche leicht geprüft werden könnten. Nur in Bezug auf *C. tinctoria* erlaube ich mir noch folgende Bemerkungen.

Ich nehme nach Herrn Kieffer's ausgezeichneter Darstellung der Cynipiden [2]) an, dass die in der Literatur vorkommenden Beschreibungen dieser Art auf zwei ganz verschiedene Varietäten Bezug haben, welche er als *C. tinctoria* und *C. tinctoria* var. *nostras* bezeichnet [3]).

Letztere, welche auf *Q. pedunculata, Q. sessiliflora* und *Q. pubescens* vorkommt, ist bekanntlich so nahe mit *C. kollari* verwandt, dass der berühmte niederländische Entomologe, weiland Snellen van Vollenhoven, als die grosse Invasion von *C. kollari* in Holland um das Jahr 1865 stattgefunden hatte, diese Art eben unter dem Namen *C. tinctoria* beschrieb. Ich zweifle gegenwärtig nicht daran, dass die sexuelle Generation von *C. tinctoria* var. *nostrus* auf *Q. cerris* lebt, und ich spreche die Vermutung aus, dass *Andricus burgundus* diese sexuelle Form sein muss. Meine Gründe dafür liegen in ihrer Uebereinstimmung mit *A. circulans,* welche durch Herrn Wachtl und mich des Näheren nachgewiesen ist. Da *C. tinctoria* var. *nostras* hier nicht vorkommt, habe ich die Hypothese weiter nicht prüfen können, doch bitte ich jene Herren Entomologen, welche in Gegenden leben, wo diese Art heimisch ist, mir davon Material mit lebenden Wespen zuschicken zu wollen, damit ich die bezüglichen Versuche ausführen kann [4]).

Was nun aber die genuine Form von *tinctoria* betrifft, diese findet sich, wie es scheint, nur auf *Quercus infectoria* [5]). Sie hat einen anderen Verbreitungsbezirk

---

[1]) Für die vereinzelten sexuellen mit noch unbekannter agamer Generation, lassen sich in den Gattungen *Dryophanta, Neuroterus* und *Aphilothrix* die wahrscheinlich zugehörigen Agamen anweisen.

[2]) Les Cynipides pag. 560. In Publication begriffen. Die kleinen »Kronen Gallen« von Aleppo (abgebildet in Cauvet, Nouveaux éléments de Matière Médicale, t. I, pag. 139, fig. 73, Paris 1886) halte ich für nicht ausgewachsene Tinctoriagallen. Die »Kronenbildung« ist für die ganze Gruppe charakteristisch und kommt auch bei Kollari vor, besonders auf *Q. pubescens.*

[3]) Aus einer Bemerkung von Herrn Dr. Trotter ersehe ich, dass *C. tinctoria-nostras* de Stefani nicht als Varietät sondern als »bona species« aufzufassen ist.

[4]) Die gleiche Bitte thue ich in Bezug auf die übrigen obengenannten Cynipsarten, wovon keine in Niederland vorkommt.

[5]) Herr Dr. Trotter bemerkt hierzu das folgende: »*C. tinctoria* a été trouvée aussi sur *Q. pedunculata*; je l'ai récoltée moi même, sur cette chêne dans l'Asie mineure«.

wie *nostras*, und dürfte auf den Orient beschränkt sein, was auch Herrn Kieffer's Ansicht zu sein scheint.

In systematischer Hinsicht steht *Q. infectoria* der Cerrisgruppe viel näher, wie der Pedunculatagruppe, was schon daraus erhellt, dass sie, eben wie *Q. cerris* selbst, zweijährige Fruchtreife besitzt, — ein Merkmal, welches bei der grossen Analogie zwischen Früchten und Gallen, für die Cecidiogenese gewiss von tiefer physiologischer Bedeutung ist. — Ich betrachte es darum als möglich, selbst als wahrscheinlich, dass die sexuelle Generation von *C. tinctoria* ebenfalls auf *Q. infectoria* zu suchen ist, und, dass die Galle sich als eine mit denjenigen von *A. circulans* und *A. burgundus* ganz nahe verwandte Bildung ergeben wird.

Sur l'assimilation de l'azote libre par les bactéries.

Par M. W. BEIJERINCK et A. VAN DELDEN.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome VIII, 1903, p. 319—373. — Verscheen onder den titel »Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, IX. Band, 1902, S. 3—43.

On a vu [1]) que dans des solutions nourricières, qui ne contiennent que des traces de composés azotés mais où les autres aliments sont présents en quantité suffisante, avec le carbone sous forme d'hydrocarbure et où l'air a librement accès, l'infection par du terreau de jardin ou par toute autre terre fertile conduit à de riches cultures d'une bactérie caractéristique, l'*Azotobacter chroococcum;* cette bactérie l'emporte bientôt sur toutes les autres espèces qui l'accompagnent, au point de constituer la grande majorité des organismes présents dans la masse, sans la constituer toutefois exclusivement. Nous avons reconnu en outre que dans cette expérience l'azote libre de atmosphère peut être fixé en grandes quantités.

Des observations ultérieures nous ont appris qu'à l'état de culture pure, dans nos solutions nourricières pauvres en azote, le *Chroococcum* n'assimile pas notablement l'azote (Epreuves 31*a*, 31*b* et 31*c*); au contraire, sa croissance et sa multiplication s'arrêtent bientôt, bien que la source de carbone soit encore loin d'être épuisée. On doit conclure de là que la multiplication de *Chroococcum* dans les cultures grossières, accompagnée d'une consommation complète de la nourriture carbonique et de fixation d'azote, repose sur une symbiose avec d'autres microbes.

Nous avons reconnu que ces symbiontes, nécessaires au développement de *Chroococcum*, sont des bactéries appartenant à deux groupes: des bactéries sporogènes du genre *Granulobacter* et d'autres sans spores, dont nous avons particulièrement pu examiner deux formes d'une façon détaillée. Ces formes sont l'une l'*Aërobacter aërogenes* bien connu, l'autre une espèce très polymorphe, non encore décrite et à laquelle nous donnerons le nom de *Bacillus radiobacter*.

Toutes les espèces du genre *Granulobacter*, tant aérobies qu'anaérobies, possèdent déjà d'elles-mêmes le pouvoir de fixer l'azote libre; ce n'est toutefois qu'en symbiose avec *Chroococcum* que cette propriété est complètement développée.

Par contre, il est certain qu'*Aërogenes* ne peut pas fixer tout seul l'azote libre et nous ne sommes pas davantage parvenus à démontrer ce pouvoir pour des cultures pures de *Radiobacter*.

---

[1]) Ces *Archives*, (2), 8, 190, 1903.

On voit ainsi qu'*Aërogenes* et *Radiobacter* acquièrent la propriété d'assimilation par symbiose avec *Chroococcum,* à moins que ce ne soit le *Chroococcum* même qui acquière ainsi cette même propriété. Il se pourrait d'ailleurs que les deux éventualités soient réalisées à la fois.

Nous avons cru pendant longtemps que le *Chroococcum* seul devenait par symbiose l'agent fixateur. A présent nous sommes d'un avis contraire et devons admettre que ce sont précisément *Radiobacter* et *Aërogenes* qui acquièrent ce remarquable pouvoir par symbiose. Pour *Radiobacter,* qui est proche parent du *B. radicicola* des tubercules des Papilionacées, cette manière de voir paraît naturelle, mais nous devons accorder qu'il en est autrement pour les différentes formes d'*Aërogenes.* Aussi avons-nous hésité longtemps avant d'admettre la possibilité d'une assimilation d'azote par ce dernier groupe, surtout parce que ce ne sont pas toutes les expériences, sans exception, qui permettent de se convaincre de la réalité du phénomène; cela nous engagea à chercher si, dans les expériences avec *Aërogenes* et *Chroococcum,* où nous observions réellement une fixation d'azote, il n'y avait pas eu fortuitement infection par *Granulobacter.* Mais, comme l'examen le plus minutieux de nos cultures décisives ne nous a jamais fait découvrir ce dernier genre, nous sommes bien forcés de considérer également l'*Aërogenes* comme un fixateur d'azote par symbiose avec *Chroococcum.*

En étudiant les combinaisons des *Granulobacter* avec *Chroococcum* nous avons découvert la circonstance remarquable suivante: *Le nombre des bâtonnets de Granulobacter, présents dans les solutions nourricières et suffisants pour produire une croissance profuse du Chroococcum, peut être si petit qu'il est souvent difficile de les découvrir au microscope parmi les milliers de cellules de Chroococcum.* D'un côté, il nous semble prouvé par là que l'avantage de la symbiose de *Chroococcum* pour les bactéries fixatrices d'azote ne peut pas consister en une simple diminution de la pression de l'oxygène, par suite de la forte croissance de *Chroococcum,* bien qu'il soit démontré que cette diminution de pression est propice à la fixation d'azote, du moins par *Granulobacter. D'un autre côté nous en tirons cette conclusion importante que le premier produit de l'assimilation d'azote est un composé azoté qui existe dans le liquide à l'état libre, c. à d. en dehors des bactéries qui le forment, et est ainsi à la disposition de tous les microbes et autres organismes dont il peut satisfaire le besoin d'azote.*

Cette règle doit être générale. Elle est certainement vraie pour le produit engendré par *Granulobacter* et absorbé par *Chroococcum,* qui s'en sert pour sa croissance. Elle doit aussi s'appliquer au composé azoté produit par *Radiobacter,* car, bien que dans la symbiose de cette espèce avec *Chroococcum* dans un liquide nourricier privé d'azote ce soit surtout le *Radiobacter* qui se développe, on observe néanmoins aussi une forte croissance de *Chroococcum,* de sorte que cette espèce aussi y doit avoir une combinaison azotée à sa dispositon. Dans ces conditions il n'y a pas lieu de douter que la même règle s'applique à *Aërogenes.*

Nous n'avons pas encore pu déterminer la nature de cette combinaison, formée aux dépens de l'azote libre de l'atmosphère; à la fin de ce travail nous donnerons quelques considérations relatives à ce produit. Pourtant son existence certaine renverse la vieille théorie, d'après laquelle l'albumine des bactéries serait le premier produit d'assimilation d'azote que l'on puisse reconnaître, de sorte que l'opinion actuellement la plus répandue, au sujet de l'augmentation naturelle de la quantité d'azote dans le sol, doit également être modifiée.

Comme les spores, surtout celles des espèces aérobies de *Granulobacter,* sont très résistantes et supportent même une forte ébullition, et que la présence de ces microbes dans les cultures de *Chroococcum,* même quand cette présence peut être décelée difficilement par un examen microscopique, suffit à produire une notable fixation d'azote, il est nécessaire de prendre des précautions toutes particulières pour les cultures combinées avec les espèces qui n'engendrent pas de spores, et de stériliser soigneusement les liquides nourriciers. C'est cette circonstance qui a fait que nous avons cru pendant si longtemps que, chaque fois que nous observions une fixation d'azote dans les cultures de *Chroococcum,* combiné avec des microbes non-sporogènes, ces cultures contenaient quelques rares germes de *Granulobacter* qui, en dépit de toutes nos précautions, avaient été présents dans la matière d'infection considérée à tort comme pure, et avaient ainsi passé dans le liquide nourricier ou y étaient tombés lors de l'infection. Mais, ainsi que nous l'avons dit tantôt, après de nombreuses expériences, il n'était plus possible de douter de l'exactitude de nos observations.

Toutes les espèces du genre *Granulobacter* perdent facilement leur pouvoir fixateur d'azote libre par une culture prolongée à l'air, comme c'est le cas p. ex. pour les cultures pures sur un terrain solide. La preuve de ce fait nous a paru importante et nous a engagés à insérer dans les tableaux mainte détermination qui autrement n'aurait pas dû être prise en considération, en égard à la faible quantité d'azote fixée. Mais, comme ces déterminations se rapportaient toujours à des cultures qui, au commencement, c. à d. après leur isolation récente, avaient donné un gain d'azote très considérable, il n'était pas sans intérêt de les noter.

La perte de cette fonction va exactement de pair avec le pouvoir que possèdent les mêmes formes de se contenter de peu d'oxygène pour leur croissance, c. à d. avec la perte de leur microaérophilie, ce qui résulte aussi de leur culture en plein air. [1])

Pour des expériences sur la fixation d'azote, où l'on se sert de *Granulobacter,* ces remarques sont importantes: si l'on désire fixer beaucoup d'azote, il est recommandable de se servir de cultures pures fraîchement isolées. A cet effet on doit introduire dans la solution nourricière du terreau pasteurisé et le *Chroococcum;* au bout de 2 à 3 jours on obtient une culture profuse de *Granulobacter* + *Chroococcum.* On inocule ensuite sur de l'agar au glucose, et les colonies aérobies de *Granulobacter* ainsi obtenues, qui généralement s'étendent de tous côtés jusqu'à de grandes distances, sont immédiatement mises à profit pour les cultures combinées. Si l'on veut transporter le microbe sur un terrain solide dans des éprouvettes pour des cultures en séries, on fait bien d'y ajouter le *Chroococcum,* parce qu'on évite ainsi jusqu'à un certain point la dégénérescence du *Granulobacter,* le *Chroococcum* diminuant la tension de l'oxygène en solution dans le milieu de culture.

La haute pression de l'oxygène atmosphérique a pourtant une influence analogue sur la variation de *Chroococcum* et sur celle des symbiontes qui ne forment pas de spores, notamment le *Radiobacter,* quoiqu'ici les effets soient moins nets et échappent aisément à l'observation. Je dois toutefois insister ici sur ce point. Le *Chroococcum* est une bactérie très variable, tant au point de vue de la physiologie de sa nutrition que sous d'autres rapports; c'est ainsi qu'elle peut perdre sa propriété remarquable de se colorer

---

[1]) On ne peut pas se servir ici du mot »anaérobiose«, puisqu'il s'agit d'espèces qui se laissent fort bien cultiver à l'air libre.

en brun, parfois de façon locale dans une seule colonie, de manière à donner une colonie divisée en de nombreux secteurs, les uns obscurs les autres clairs. C'est cette variation qui explique les irrégularités des nombres obtenus dans l'analyse de nos accumulations, si le mélange des espèces obtenu dans chaque cas particulier ou le procédé de culture ne fournissent pas une explication suffisante des divergences observées.

Nous pouvons donc dire tout simplement que la fixation d'azote exige un état déterminé d'accomodation, qui se trouve réalisé chez les germes en question, aussi bien dans le sol même que dans les cultures fraîchement isolées, obtenues par le procédé des plaques, et qui se perd plus ou moins rapidement, et d'une façon plus ou moins complète, dans nos cultures en plein air et sur substratum solide. En transportant toutefois les accumulations sans interruption dans les solutions nourricières, la constance peut être conservée.

On verra que nos expériences ressemblent à celles de M. Winogradsky[1]). Que nous sommes arrivés, à plus d'un point de vue, à d'autres résultats que lui doit être attribué pour une partie au fait que nous avons diminué, pour une partie de nos expériences, ou même empêché complètement l'anaérobiose qui était la base des expériences de ce savant; pour une autre partie à l'introduction de *Chroococcum*, par laquelle nous avons atteint une amélioration notable du procédé de culture, même dans les expériences avec des organismes anaérobies, ce qui nous a permis, dans des cas avantageux, de fixer deux fois plus d'azote libre que les quantités les plus fortes que M. Winogradsky a obtenues.

---

1. Les cultures accumulatrices de Chroococcum au point de vue bactériologique.

Pour l'accumulation de *Chroococcum* nous nous sommes servis du liquide nourricier suivant, déjà décrit antérieurement: Eau de conduite 100, mannite (ou glucose) 2, K^2HPO^4 *0,05*. Nous en avons introduit une couche peu épaisse dans de grands ballons à fond plat, et nous avons cultivé pendant 24 heures environ à 28° C. et plus loin à 23° C. Les ballons étaient bouchés au moyen d'ouate et avec du papier à filtrer entouré d'un fil de plomb; une aération artificielle de la mince couche liquide était superflue. Nous avons établi par plusieurs expériences qu'il n'était pas possible de reconnaître aux quantités d'azote fixé quand l'air entrant était privé de traces de combinaisons azotées, par un lavage à l'acide sulfurique, et quand il ne l'était pas, ainsi que l'on pouvait s'y attendre, en égard à la courte durée de l'expérience et des quantités considérables d'azote assimilées. D'ailleurs les cultures à croissance rapide et précoces, où le sucre disparaissait le plus vite, rapportaient le plus d'azote; cela ne s'applique toutefois pas aux cultures pures, dont la croissance est généralement lente.

La première infection de la solution nourricière avait lieu ordinairement avec du terreau frais; dans les inoculations suivantes il était inutile d'ajouter encore du ter-

---

[1]) Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. *Arch. d. Sc. biol. de St. Pétersbourg*, T. III, 1895, n⁰. 4.

reau, quoique l'addition d'une petite quantité de terre stérilisée, dans le but d'introduire une petite quantité de composés azotés, fût très favorable à la croissance. Déjà au bout de deux ou trois transports les amibes, monades et infusoires ont disparu et, malgré le mélange assez complexe de bactéries, la culture conserve pendant tous les autres transports un caractère assez uniforme, toujours accompagné de fixation d'azote, ainsi que le prouva une série de plus de 40 transports.

Cette série entière de plus de 40 inoculations fut conduite dans la solution de mannite (100 p. d'eau de la distribution, 2 de mannite, 0,05 de K^2HPO^4). Une concentration de sucre plus forte que 2 à 4% ne se montra pas favorable à la fixation d'azote: quand on emploie plus de 2% la disparition du sucre est très lente. On peut opérer le transport d'une solution de mannite dans une solution de glucose (2 p. de glucose au lieu de mannite) et alors le rapport d'azote est très grand. Il n'est toutefois pas possible de faire ces transports sans interruption dans un liquide nourricier au glucose, parce qu'il se développe alors rapidement des bactéries aérobies acidifiantes, productrices d'acide lactique, ou des ferments butyriques qui empêchent toute croissance. Les organismes aérobies acidifiant le glucose sont précisément les plus communes de toutes les bactéries, notamment les *Fluorescentes* (liquéfiantes et non liquéfiantes) et les espèces d'*Aërobacter*. Nous devons donc mettre en évidence que l'emploi de notre liquide nourricier, avec la mannite comme source de carbone, où non seulement le *Chroococcum*, qui est un puissant formateur d'alcali en toutes circonstances (même en présence de glucose), mais où les *Fluorescentes* aussi ne forment que de l'alcali et où le ferment butyrique ne se développe que difficilement, ou même pas du tout, a une importance capitale dans nos expériences. La simplicité et la netteté de nos résultats doivent être attribuées à cet emploi.

Aussi n'avons-nous généralement pas ajouté de craie à nos liquides de culture, et dans les cas où nous l'avons fait, pour neutraliser l'acide probablement formé, nous n'avons pas obtenu de résultats favorables. Nous devons même faire remarquer que, dans toutes les expériences rapidement terminées et qui rapportèrent beaucoup d'azote, nous n'avons pas pu déceler d'autre acide libre que de l'acide carbonique [1]), et que dans toutes celles où se formaient des quantités notables d'acide lactique ou butyrique libres, ce que la présence de craie n'empêchait qu'incomplètement, la fixation d'azote n'était que médiocre.

Dans tous les cas la culture accumulatrice de *Chroococcum* est capable de transformer un peu d'acide libre en acide carbonique et en eau. Quand il s'agit d'acide butyrique, cette oxydation est accompagnée d'une forte coloration brune des pellicules de *Chroococcum*, à laquelle on reconnaît immédiatement ces cultures. Mais toujours quand il y a production d'acide, d'une façon permanente ou passagère, le rapport d'azote fixé laisse à désirer.

Par contre, le développement d'anhydride carbonique et d'hydrogène par *Granulobacter* et *Aërobacter*, non accompagné de formation d'acide, indique une bonne assimilation d'azote. Bien souvent on constate alors la formation de petites quantités des alcools propylique et butylique.

---

[1]) Il est évident qu'il peut s'être formé de l'acide libre que les microbes oxydaient ou neutralisaient au fur et à mesure qu'il était mis en liberté.

a) Les symbiontes non-sporogènes de Chroococcum dans les cultures accumulatrices.

Au bout de 3 ou 4 jours *Chroococcum* remplit la masse entière du liquide de culture d'un mucus assez transparent, dans lequel on distingue au microscope un grand nombre de bâtonnets très fins de diverses bactéries, à côté de l'espèce principale que l'on reconnaît immédiatement à sa forme plus grosse. Pour se rendre compte le plus tôt possible du mélange d'espèces assez varié, on n'a qu'a ensemencer d'une part sur du bouillon de viande à gélatine avec 3% de saccharose et à cultiver à 23° C., d'autre part sur de l'agar pur dissous dans de l'eau de conduite contenant 2% de glucose et 0,05% de K^2HPO^4.

Au moyen du premier terrain de culture, sur lequel *Chroococcum* ne se développe pas (ou seulement par exception, en grandes colonies semblables à des gouttes d'eau), on obtient par ensemencement des accumulations, même après des inoculations répétées, un grand nombre d'espèces de bactéries, mais dans des rapports très variables. De beaucoup la plus répandue est une espèce de bactérie particulière, très variable, très intéressante à notre point de vue, non seulement parce qu'en symbiose avec *Chroococcum* (Epr. 39—44) elle permit d'obtenir l'assimilation de quantités considérables d'azote, mais encore parce qu'elle produisit l'assimilation d'azote dans quelques cultures d'espèces de *Granulobacter* (Epr. 28 et 29) où *Chroococcum* faisait défaut.

Elle donne naissance à des colonies de petite dimension, mucilagineuses, molles ou visqueuses, blanches, ne liquéfiant pas la gélatine, et engendrant de l'alcali en toutes circonstances. On observe d'ordinaire sur chaque colonie une pellicule irisée de carbonate de chaux, qui facilite le diagnostic sans toutefois l'assurer, parce que le même éclat de nacre s'observe sur les colonies d'*Aërogenes* et de *Coli*. A la surface de vieilles cultures sur bouillon de viande à gélatine, contenu dans des éprouvettes, il se forme une couche irisée par suite de la mise en liberté d'alcali, notamment à côté du trait inoculatoire, ce qui est aussi le cas chez plusieurs autres bactéries, e. a. du groupe des *Fluorescentes*, mais cela ne s'observe pas chez *Aërogenes* et *Coli* dont l'irisation se produit sur les colonies même. L'éclat nacré des colonies peut toutefois faire défaut et alors le diagnostic est plus difficile. En outre la forme et la dimension des colonies est très variable, et cette diversité est un caractère héréditaire. Après transport dans un bouillon à 0,02% de nitrite ou 0,1% de nitrate de potassium, on observe une dénitrification, c. à d. formation d'écume par la mise en liberté d'azote. Cette propriété serait très précieuse pour le diagnostic, si elle ne se perdait pas par culture. Dans nos cultures cette propriété ne se perdait toutefois pas, du moins quand nous inoculions dans du bouillon de viande à gélatine, mais elle se perdait au contraire par transport dans la solution de mannite pauvre en azote; ce n'est que quand nous avions pris connaissance de ce fait que nous avons reconnu combien était commune cette espèce, que nous avions prise d'abord pour un mélange de plusieurs espèces. Sur un terrain d'agar au glucose avec phosphate de potassium les colonies deviennent assez grandes, surtout en présence de *Chroococcum*, et alors il est difficile de les distinguer d'*Aërogenes*, parce que tous deux recouvrent d'une couche aqueuse, assez transparente, les colonies de *Chroococcum* avec lesquelles ces microbes sont venus en contact.

Aussi bien les cultures dans un liquide que les colonies sur milieu solide sont constituées par de fins bâtonnets, mobiles ou immobiles. Surtout les bâtonnets mobiles peu-

vent devenir excessivement petits et rappellent alors vivement les exemplaires mobiles de *B. radicicola*. Les immobiles sont d'ordinaire plus grands, souvent un peu courbes et assez souvent groupés en masses étoilées, tout à fait semblables aux »étoiles« que j'ai décrites antérieurement pour la dernière espèce. Tout comme chez *B. radicicola* il semble que ces agrégats étoilés prennent naissance par un mode de ramification et de segmentation particulier. Ils sont souvent, mais pas toujours, entourés de mucus. D'ailleurs on ne les observe pas toujours et cette variabilité aussi augmente les difficultés du diagnostic de cette espèce. Mais, quoique ce groupement rayonné ne soit pas un phénomène constant, nous le considérons cependant comme important au double point de vue morphologique et systématique; c'est pourquoi nous avons choisi pour notre espèce le nom de *B. radiobacter*.

Si l'on transporte une culture pure dans notre solution de mannite pauvre en azote, on peut observer une croissance notable qui peut donner l'impression d'une accumulation d'azote. On ne constate toutefois une telle fixation d'azote que quand on a introduit en même temps le *Chroococcum* dans le liquide nourricier. Quand il se forme un mucus visqueux dans une pareille culture mixte, la croissance de *Chroococcum* reste en arrière et l'on n'observe qu'une faible assimilation d'azote. Par contre, si le mélange de bactéries reste mou et délié et se compose en majeure partie de *Chroococcum*, il est certain qu'il se fixe une grande quantité d'azote. Les cultures des expériences 43 et 44 sont p. ex. restées dans cet état et elles ont fixé en un mois 70 mgr. d'azote par litre de liquide de culture, et 4 mgr. par gr. de mannite transformé.

En dehors de la dénitrification dans un bouillon de viande avec 0,1% de KNO^3, nous n'avons pas observé de fermentation chez *Radiobacter*, mais nous avons constaté une microaérophilie plus prononcée chez les cultures en solution sucrée que chez celles sans sucre. Ce sucre ne se transforme jamais en acide; au contraire, *Radiobacter* rend le liquide de culture toujours quelque peu alcalin. Des sels d'acides organiques sont énergiquement oxydés en anhydride carbonique et eau. Même les acétates ont été reconnus comme nutritifs. Nous avons également opéré avec succès avec des malates, des citrates, des propionates et des butyrates. L'optimum de croissance est situé entre 25 et 27° C., mais la température ordinaire est très favorable pour la fixation d'azote.

En examinant les accumulations transportées sur des plaques d'agar au glucose, on observe souvent des colonies minces, plates et transparentes qui sortent des grandes colonies de *Chroococcum*, dont elles s'éloignent en partie jusqu'à d'assez grandes distances. Leur transparence peut être telle qu'on ne les reconnaît que par un examen minutieux à la loupe, en lumière directe ou réfléchie. Elles peuvent aussi avoir, une plus grande force végétative et former alors des plaques assez troubles, appliquées contre l'agar.

Au microscope on y trouve de petits bâtonnets, courts et minces, dont quelques-uns seulement sont mobiles. Dans tous leurs caractères principaux, comme au point de vue de la formation d'enzyme et de la nutrition, leur analogie avec *Radiobacter* est grande, mais nous ne sommes pas parvenus à démontrer avec certitude qu'en présence de *Chroococcum* ils fixent de l'azote; nous n'avons pas davantage observé de dénitrification. Nous les tenons néanmoins pour une forme dégénérée du *Radiobacter* même.

En transportant les cultures accumulatrices de *Chroococcum* sur du bouillon de

viande à gélatine avec saccharose, on reconnaît avec un peu d'habitude, parmi les colonies de *Radiobacter,* çà et là, parfois même partout, deux formes d'*Aërobacter aërogenes* [1]) ainsi que *Aërobacter coli.* Chez ces espèces aussi on remarque l'irisation caractéristique pour les colonies de *Radiobacter,* mais celles d'*Aërogenes* et de *Coli* sont ordinairement beaucoup plus grandes que celles de *Radiobacter.* Sur de la gélatine au malt elles croissent aussi facilement et même avec plus de vigueur que *Radiobacter;* elles produisent alors souvent des bulles de gaz. Comme nous avons réussi à obtenir, dans les cultures mixtes de *Chroococcum,* à l'aide d'*Aërogenes* une faible assimilation d'azote libre [2]), nous communiquerons encore sur cette forme les détails suivants:

La variété nommée *Aërogenes* 1 dans les expériences répond aux descriptions ordinaireset engendre aux dépens du saccharose, outre de l'acide carbonique et de l'hydrogène, encore de l'acide lactique. Dans les accumulations de *Chroococcum* avec du glucose (liquide nourricier 2) où cette forme est présente, il se forme tant d'acide que la croissance de *Chroococcum* en est complètement arrêtée; on ne peut donc faire d'expériences avec cette espèce que dans une solution de mannite. La forme décrite comme *Aërogenes* 2 engendre dans du bouillon à saccharose, également de l'acide carbonique et de l'hydrogène, mais au lieu d'acide lactique une certaine quantité d'alcali. Dans les cultures accumulatrices cette propriété se conserve par transport, mais le pouvoir de fermentation et celui de former un alcali se perdent déjà après deux ou trois inoculations d'une culture pure dans du malt, en même temps que le pouvoir acidifiant prend naissance. Voilà donc un exemple typique d'accomodation à des conditions nutritives spécifiques. Je dois encore faire remarquer ici que toute séparation d'*Aërogenes* ne fournit pas nécessairement une forme avec laquelle il est possible d'obtenir, en compagnie de *Chroococcum,* une assimilation d'azote, et que même avec les formes en question les expériences n'ont pas réussi sans exception, ce qui nous a conduit à examiner maintes fois et avec beaucoup de soin les cultures où l'assimilation se produisait, sans que nous ayons pu y découvrir des bactéries étrangères.

Il n'y avait pas lieu d'examiner encore d'autres bactéries présentes dans les accumulations, non que les formes déjà mentionnées constituassent toute la richesse de cette flore, mais parce que nous croyions pouvoir conclure de l'apparition irrégulière de plusieurs d'entr'elles qu'elles ne pouvaient avoir qu'une importance fortuite. C'est ce que l'on peut certainement prétendre au sujet des *Fluorescentes,* dont *Fl. non liquefaciens* disparaît complètement après de nombreux transports, tandis que *Fl. liquefaciens* ne disparaît pas totalement, il est vrai, mais diminue souvent notablement après quelques inoculations, pour redevenir tout à coup beaucoup plus important. Il n'est toutefois pas impossible que la difficulté de reconnaître les espèces de bactéries en général ait fait que nous n'ayons pas trouvé l'une ou l'autre forme, importante cependant, mais qui n'existait pas par hasard dans notre série principale de plus de quarante inoculations, spécialement examinée. Je dois néanmoins faire observer que plusieurs autres séries plus petites ont été également examinées bactériologiquement d'une manière assez précise et que nous y avons toujours reconnu le *Radiobacter* et *Aërobacter* à côté de *Chroococcum.*

---

[1]) *Bacillus lactis aërogenes.*

[2]) Ainsi que nous l'avons déjà dit il n'a pas été possible de découvrir dans ces cultures mixtes, ni au microscope ni par culture, la moindre trace d'infection étrangère.

b) Les formes aérobies et sporogènes de Granulobacter comme compagnons de Chroococcum dans les cultures accumulatrices.

Les symbiontes de *Chroococcum* dont il vient d'être question n'engendrent pas de spores et ne se rencontrent donc pas dans les accumulations pasteurisées. Mais, aussi bien dans les accumulations ordinaires que dans celles que l'on obtient dans les liquides nourriciers infectés au moyen de terre pasteurisée et de *Chroococcum,* on rençontre encore toute une série de bactéries sporogènes dont, pour autant qu'elles se conservent dans les transports successifs, grâce à l'assimilation d'azote, plusieurs appartiennent au genre *Granulobacter.* Elles sont pour la plupart »aérobies«, mais appartiennent aussi en partie aux ferments butyliques et butyriques »anaérobies«, que nous traiterons spécialement dans le paragraphe suivant. Les mots »aérobie« et »anaérobie« sont employés ici dans le sens ordinaire, mais on doit remarquer que toutes les espèces de *Granulobacter* sont plus ou moins »microaérophiles«[1]) les ferments butyliques et butyriques même au point qu'en plein air ils ne croissent pas du tout et les autres fort peu. Quoique l'on puisse donc isoler et cultiver les dernières à l'air libre, ces espèces n'en supportent pas à la longue la pression complète et finissent par perdre plusieurs de leurs propriétés primitives. Pour les formes mobiles on peut démontrer la microaérophilie d'une façon particulièrement frappante: en préparation microscopique sous couvre-objet on les voit notamment se réunir, à la manière des spirilles, suivant une »ligne de respiration«, à quelque distance du ménisque, où la pression de l'oxygène est relativement faible.

D'ordinaire il est aisé de reconnaître ces espèces aussi dans les accumulations obtenues par infection avec de la terre fraîche, mais dans les transports successifs cela devient de plus en plus difficile; au bout de plusieurs inoculations le *Radiobacter,* et les autres compagnons non sporogènes de *Chroococcum,* refoulent le *Granulobacter* d'une façon si complète, qu'il n'est plus possible de le découvrir sous le microscope et que même les méthodes par culture restent sans résultat.

Leur isolation réussit par contre aisément quand on part de la méthode, citée en seconde ligne, c. à d. de la culture »par accumulation partielle«, qui résulte de l'infection d'une solution nourricière à mannite au moyen de terre pasteurisée et de *Chroococcum.* La pasteurisation s'obtient en suspendant la terre pendant 5 minutes dans de l'eau chauffée à 85° C. Dès que les cultures à 28° C. commencent à montrer une pellicule de *Chrococcum* bien développée, ce qui prouve que la fixation d'azote est en train, on s'en sert pour tracer des traits inoculatoires sur des plaques d'agar au glucose et phosphate[2]), donc sur le même terrain que celui sur lequel nous avons isolé le *Chroococcum* lui-même; ces plaques sont ensuite exposées également à une température de 28° C. Nous avons isolé de cette manière 5 formes appartenant au

[1]) Ainsi que je l'ai montré antérieurement (ces *Archives,* (2), 2, 397, 1899), il n'existe pas d'organismes anaérobies, dans le sens strict du mot; mais les organisms appelés anaérobies ont besoin d'oxygène libre.

[2]) De pareilles plaques, obtenues au moyen de 2 gr, d'agar, 2 gr. de glucose et 0,05 gr. de K^2HPO^4 dans 100 cm³. d'eau de conduite, sont très humides après solidification dans la boîte de verre; on doit donc les chauffer avec précaution et lentement *à l'état solide* jusqu'à ce que leur surfaces soit entièrement »sèche«. Les quelques gouttes d'eau qui s'évaporent se condensent sur le couvercle, que l'on essuie après.

genre *Granulobacter* [1]). dont chacune fixe de l'azote par symbiose avec *Chroococcum*. Elles sont assez proches parents les unes des autres et peuvent probablement être réduites à une ou deux espèces.

Nous avons notamment constaté que les formes isolées des accumulations perdent plus ou moins complètement leur caractère primitif par transport répété dans les cultures pures; il en résulte une convergence des diverses formes vers une forme limite, qui n'est toutefois atteinte par aucune d'elles.

On doit chercher la raison de cette transformation dans le fait que ces organismes ne supportent pas, à la longue, la pression de l'oxygène atmosphèrique; tout ce qui diminue cette pression retarde aussi la vitesse de transformation. On y arrive p. ex. en introduisant, dès le commencement, dans les cultures pures de *Granulobacter* des espèces fortement aérophiles, p. ex. *Chroococcum* + *Radiobacter*. Mais même cet artifice ne préserve pas complètement contre une modification des propriétés originelles, et l'on trouve à la longue, en toutes circonstances, dans les cultures pures des variétés différentes de celles que l'on y avait introduites.

D'après les rapports de parenté les cinq formes aérobies, dont nous avons fait usage dans nos expériences, peuvent être classées comme suit:

Granulobacter polymyxa,
„ „ var. *tenax*,
„ „ var. *mucosum*,
„ *sphaericum*,
„ *reptans*.

Gr. polymyxa. Cette espèce, très répandue dans le sol, a déjà été décrite antérieurement par l'un de nous dans un travail sur la fermentation butylique [2]); nous l'avons retrouvée depuis très souvent dans le terreau de jardin. Le *B. solaniperda* Kramer [3]) est probablement identique avec elle, ou du moins c'est une variété très voisine. Le *Polymyxa* produit dans l'extrait de malt une fermentation active et de longue durée; il se forme alors une culture mucilagineuse, qui se recouvre d'une couche de mousse filante et persistante et qui se dilate fortement par le gaz provenant de la fermentation et consistant presque exclusivement en acide carbonique. L'écume est constituée par des bâtonnets mobiles et par des clostridies minces, sporifères, ne contenant que peu de granulose. Sur de la gélatine au malt il commence par se former des colonies transparentes, minces, qui plus tard liquéfient énergiquement et sont alors fort semblables à celles de *B. mesentericus vulgatus*.

Cette espèce, je l'ai cultivée depuis plusieurs années comme une espèce aérobie ordinaire, et c'est avec une pareille culture d'ancienne date que j'ai observé, en symbiose avec *Chroococcum*, régulièrement une fixation notable d'azote (Epr. 45), tandis qu'une culture pure où le *Chroococcum* fait défaut ne se développe qu'exceptionellement (voir § 5) dans la solution nutritive pauvre en azote. Les nitrates sont énergiquement réduits en nitrites et sels d'ammonium, mais non en azote. En présence de sucre les premières substances constituent la meilleure source d'azote, mais les nitrites

---

[1]) Pour la description de genre je renvoie à mon travail: Sur la fermentation et les ferments butyliques. (*Ces Archives*, (1), 29, 10, 1896.)

[2]) Fermentation et ferments butyliques (l. c. avec planche).

[3]) Migula, System der Bakterien, Bd. II, 1900, p. 573.

et les sels ammoniacaux aussi peuvent remplir ce côle. Notre microbe supporte toutes ces combinaisons azotées dans des concentrations beaucoup plus élevées que *Chroococcum*, ce qui fait que quand on a un mélange des espèces dans une solution nourricière privée d'azote, la dernière disparaît par l'addition même de petites quantités (p. ex. 0,1 %) de ces combinaisons en faisant place au *Polymyxa*.

Les deux variétés de *Polymyxa*, qualifiées de *Tenax* et *Mucosum*, ont été isolées du sable de bruyère aride, où elles sont très répandues [1]). Le nom de *Tenax* a été donné à cette variété parce qu'elle s'attache fortement à l'agar, d'où elle ne se laisse détacher que difficilement au moyen d'un fil de platine. *Mucosum*, par contre, recouvre d'une couche mucilagineuse épaisse et peu adhérente la plaque d'agar au glucose et ressemble beaucoup à *Chroococcum*, sauf que les colonies de ce dernier sont troubles comme de l'empois, tandis que celles de *Mucosum* sont plutôt transparentes. Au microscope on observe chez *Tenax* et chez *Mucosum* des bâtonnets et de minces clostridies avec spores allongées (Epr. 47 et 48).

Granulobacter sphaericum. Cette bactérie intéressante a déjà été décrite brièvement dans une communication précédente sur des oligonitrophiles [2]). Depuis nous l'avons soumise à diverses expériences et nous l'avons isolée à nouveau maintes fois.

Les petites clostridies, presque sphériques ou piriformes, avec spores allongées, se laissent isoler ordinairement des accumulations infectées par du terreau ou par du sable des dunes, de préférence après chauffage de ces matériaux jusqu'à 85° C. Par transport les clostridies s'amincissent et s'allongent, tandis que, par une culture prolongée à l'air libre, plusieurs souches perdent leur force végétative. Dans d'autres cas la forme est beaucoup plus stable et se rapproche alors davantage de l'espèce précédente; chez cette forme moins variable les spores et les clostridies sont d'ailleurs plus grandes. La transformation des cultures est surtout lente quand on cultive sur de l'agar au glucose pauvre en azote; en symbiose avec *Chroococcum* + *Radiobacter* on observe alors une croissance exubérante et une forte formation de mucus chez les trois espèces. Nous n'avons jamais observé de croissance sur de la gélatine au malt. Les colonies sur de l'agar au glucose ont une tendance à se développer latéralement et à se ramifier; elles rappellent ainsi *Bacillus subtilis*.

La variabilité de *Gr. sphaericum* est intimement liée à sa microaérophilie, qui est assez prononcée. La forme n'est pas absolument anaérobie, ainsi qu'il résulte déjà de sa simple isolation à l'air libre; cependant les cultures exposées en plein air perdent rapidement leurs propriétés, surtout le pouvoir de fermentation et la tendance à former des clostridies. De même l'intensité avec laquelle se fixe l'azote libre en présence de *Chroococcum* diminue sous l'influence d'une aération prolongée; le pouvoir ne se perd toutefois pas complètement et, quand on ne regarde pas au temps, le rendement final, obtenu avec des cultures vieillies et peu actives, n'est même pas beaucoup plus petit qu'avec des cultures fraîches.

---

[1]) Plusieurs échantillons de sable de bruyère, recueillis à Wageningen et pris à diverses profondeurs, m'ont été fournis par mon ami M. le Dr. O. Pitsch. Je n'ai pu déceler *A. chroococcum* dans aucun d'eux. Pourtant, au moyen des formes de *Granulobacter* que j'en ai isolées, je n'ai pu observer de fixation d'azote que quand le liquide de culture contenait en outre *A. chroococcum*, d'autre provenance, et j'ai vainement tâché d'isoler du sable d'autres espèces qui fixassent l'azote de l'air en symbiose avec *Granulobacter*.

[2]) Ces *Archives*, (2), 8, 204, 1903,

Des colonies fraîchement isolées, cultivées en même temps que *Chroococcum* dans le liquide nourricier à glucose et sans azote, croissent avec beaucoup de rapidité en assimilant l'azote libre et donnent naissance à un mélange d'alcool propylique et d'un peu d'alcool butylique, ainsi qu'à un arome spécifique particulièrement agréable. Il se forme en même temps de petites quantités d'hydrogène et d'anhydride carbonique. L'aspect microscopique de ces cultures est surprenant à cause de la riche croissance des deux espèces, mais, dans des conditions encore inconnues, le développement de *Chroococcum* s'arrête et cet organisme peut alors même être refoulé complètement par *Gr. sphaericum.* De pareilles cultures peuvent néanmoins fixer beaucoup d'azote, d'où l'on doit conclure que *Gr. sphaericum* doit de lui-même, sans *Chroococcum,* être en état de fixer l'azote libre et d'employer même pour sa croissance la combinaison azotée à laquelle il a lui-même donné naissance. Pourquoi la présence de *Chroococcum* est pourtant si avantageuse, voilà ce qui est encore incomplètement expliqué. Il est certain que cette influence ne consiste pas seulement en un enlèvement d'oxygène, car, si telle était la seule cause, bien d'autres bactéries devraient être en état de remplir le même rôle que *Chroococcum,* ce qui n'est pas du tout le cas. C'est ainsi que nous avons essayé les cultures combinées suivantes, aussi bien dans des solutions de mannite que dans des solutions de glucose, et toutes avec un résultat négatif: *Sphaericum* + *Mesent. vulgatus, Sphaericum* + *Subtilis, Sphaericum* + *Aërogenes 1, Sphaericum* + *Fluorescens non liquefaciens, Sphaericum* + *Aërogenes 2, Sphaericum* + *Radicicola* (de trèfle blanc), *Sphaericum* + *Radiobacter.* En aucun cas nous n'avons observé une croissance quelque peu importante, bien que nous eussions conduit les cultures pendant des mois. Nous avons souvent essayé aussi d'activer la croissance de pareilles cultures combinées, ou même de cultures pures de *Sphaericum,* en limitant l'accès de l'air, le tout en vain. Seule l'addition de *Chroococcum* était capable de produire une croissance et une fixation d'azote, surtout avec *Gr. sphaericum.*

Sphaericum est une bactérie très répandue que l'on trouve aussi dans l'eau de la distribution, au point que, quand nos solutions ordinaires de mannite ou de glucose étaient simplement portées à l'ébullition sans être stérilisées, des semences de *Chroococcum* s'y développaient parfois fortement; mais on constatait alors toujours une infection avec l'une ou l'autre espèce de *Granulobacter.*

Granulobacter reptans. C'est une forme intermédiaire entre l'espèce précédente et *Gr. polymyxa;* on l'obtient en culture pure de la même façon que *Gr. sphaericum,* notamment dans notre solution nutritive ordinaire, pauvre en azote, par infection avec du terreau pasteurisé + *Chroococcum.* Dès que la forte croissance a commencé, on s'en sert pour tracer des traits inoculatoires sur de l'agar au glucose; il se forme alors, comme dans le cas précédent, des colonies fortement ramifiées, en couche mince et s'étendant bien loin. On peut toutefois obtenir aussi les colonies caractéristiques de *Reptans* en transportant les cultures, obtenues par infection au moyen de terre pasteurisée + *Chroococcum,* sur des plaques de gélatine au malt, où *Sphaericum* ne se développe pas et où les colonies de *Reptans* sont très faciles à reconnaître. Elles y forment notamment de masses en plaques minces, étendues, assez consistantes, constituées par des bâtonnets et des clostridies allongées et sporifères. Par l'iode elles se colorent en bleu intense ou violet foncé. Dans une solution de malt *Reptans* produit une forte fermentation, tout comme *Polymyxa.* Les bâtonnets qui se forment pendant cette fermentation se groupent sous le couvre-objet dans des figures de respiration

comme des spirilles, toutefois à une distance beaucoup plus grande du ménisque, ce qui prouve leur forte microaérophilie. Des cultures longtemps poursuivies dans du malt liquide liquéfient énergiquement la gélatine au malt où on les transporte, tandis que des colonies fraîchement isolées y croissent pendant des semaines sans provoquer de liquéfaction.

Bien qu'il soit certain qu'il se fixe beaucoup d'azote dans les accumulations bien aérées, par symbiose de *Chroococcum* avec les espèces aérobies de *Granulobacter,* nous sommes néanmoins convaincus que ces espèces sont d'autant plus actives que leur microaérophilie est plus prononcée, ce que l'on peut reconnaître à l'éloignement de leur »ligne de respiration« du ménisque dans les préparations microscopiques. Nous avons reconnu dans tous les cas que des colonies fraîchement isolées, fort microaérophiles, de *Sphaericum* et de *Reptans* fixent, dans un temps déterminé, plus d'azote que les mêmes colonies devenues plus aérophiles par une longue culture à l'air libre. Leur activité spécifique ne se perd toutefois pas complètement, même après une culture aérobie de deux années.

c) Les ferments anaérobies butyriques et butyliques des cultures accumulatrices.

Bien que le but principal de ce travail soit de prouver la fixation d'azote dans les cultures aérobies, la clarté exige que nous communiquions quelques résultats obtenus avec les espèces vraiment anaérobies de *Granulobacter,* c. à d. avec les formes de ce genre ne croissant pas à l'air libre, mais cependant microaérophiles, comme les précédentes. Les espèces dont il s'agit ici ont été décrites antérieurement comme *Gr. butylicum* et *Gr. saccharobutyricum* [1]). Les cultures qui ont servi à ces descriptions étaient obtenues dans des expériences à l'aide de malt de farine, et ne sont pas, à la vérité, complètement identiques avec les ferments butyriques et butyliques trouvés dans nos accumulations actuelles. C'est ainsi qu'un malt de farine n'entre pas immédiatement en fermentation butylique, sous l'influence d'une culture de *Chroococcum* + ferment butyrique dans notre liquide nourricier au glucose; il faut pour cela une certaine accomodation [2]), et il en est de même du ferment butylique. Au reste, les formes que l'on obtient dans ces conditions de culture si différentes sont tellement identiques qu'on ne doit pas songer à baser sur la différence d'accomodation la détermination de nouvelles espèces ou même de variétés. Aussi sommes-nous pleinement convaincus que ce sont les mêmes spores qui, dans l'infection au moyen de terreau de moût de farine ou de notre liquide au glucose pour accumulation d'azote, produisent la fermentation butyrique ou bien, quand elles appartiennent à *Gr. butylicum,* la fermentation propyl-butylique, et que ce n'est que dans ces conditions nutritives spécifiques que prend naissance l'accommodation dont nous venons de parler et qui fait donc encore défaut chez les spores présentes dans le terreau.

Au sujet de la fixation de l'azote libre par le ferment butyrique, nous sommes arrivés en principe au même résultat que M. Winogradsky [3]), qui a donné

[1]) Fermentation et ferments butyliques (ces *Archives,* (1), 29, 7, 1896).

[2]) Un examen de la question difficile et très importante de l'accomodation chez les bactéries ne serait pas à sa place ici. Je m'en occuperai à une autre occasion.

[3]) Assimilation de l'azote libre, *loc. cit.*

à l'agent de cette fermentation le nom de *Clostridium Pasteurianum;* il existe cependant une différence entre son expérience et la nôtre au sujet des bactéries concomitantes, qui rendent possible la fixation d'azote dans les fermentations butyriques. D'après lui il s'agirait uniquement d'un enlèvement d'oxygène, qui pourrait fort bien se produire par les espèces aérobies sporulentes, lesquelles restent vivantes, comme le ferment butyrique lui même, dans la terre pasteurisée. Quant à nous, nous n'avons jamais obtenu de culture satisfaisante aussi longtemps que nous suivions le précepte de M. Winogradsky, de pasteuriser la terre servant à l'infection. Il est vrai que bien souvent il se produisait ainsi dans nos liquides nourriciers une vraie fermentation butyrique, mais cette fermentation s'arrêtait toujours bientôt, comme toute croissance d'ailleurs.

Il ne se changeait rien à ce résultat quand nous nous servions pour les transports de liquides contenant, au lieu de glucose, du saccharose ou de la manite, avec ou sans craie; pas davantage en ajoutant pendant l'infection telle ou telle autre bactérie ordinaire, non sporulente, comme les *Aérobacter, Radicicola, Fluorescens liquefaciens* ou *Fluorescens non liquefaciens.* Ce n'est que par la présence de *Chroococcum* que les circonstances étaient complètement modifiées: la fermentation butyrique s'accomplissait alors régulièrement jusqu'à ce que tout le sucre avait disparu et l'on obtenait un rendement d'azote semblable à celui que M. Winogradsky avait atteint, c. à d. 3 mgr. d'azote fixé par gr. de sucre ou même plus. Dans beaucoup de ces cas l'examen par culture le plus minutieux ne permettait plus de découvrir, après quelques transports, aucune autre bactérie aérobie que *Chroococcum* et aucune autre anaérobie que le ferment butyrique.

De pareilles cultures, productives au point de vue de la formation d'acide butyrique et de fixation d'azote, se caractérisaient toujours par le fait, que la pellicule superficielle de *Chroococcum* finissait par se colorer en brun foncé passant au noir, en même temps que l'acide butyrique et le butyrate de calcium qui se formait au commencement disparaissaient complètement avec formation de carbonate de calcium, oxydation produite par *Chroococcum.* Ce processus d'oxydation, pour lequel *Chroococcum* est la seule bactérie appropriée que nous ayons trouvée, et l'absorption d'oxygène, nécessaire à l'anaérobiose du ferment butyrique, sont à notre point de vue les principales circonstances, mais non les seules, qui rendent la première bactérie si utile pour la fixation d'azote par le ferment butyrique.

Dans nos expériences d'infection au moyen de terreau pasteurisé, il est souvent arrivé qu'il ne se produisait pas de fermentation butyrique, mais une fermentation propyl-butylique [1]), aussi bien dans une solution de glucose que dans une solution de mannite. Dans de pareils cas les bactéries concomitantes aérobies et sporulentes pouvaient donner un gain d'azote, même en l'absence de *Chroococcum,* tout comme s'il se formait de l'acide butyrique. Mais, même dans ces circonstances, la présence de *Chroococcum* était si décidément avantageuse que ce n'était pas la peine d'étudier plus loin les phénomènes qui se produisaient quand le *Chroococcum* faisait défaut. Enfin, plusieurs infections au moyen de terreau, qui n'était même pas pasteurisé, ont

[1]) Autrefois nous étions d'opinion que cette fermentation produisait essentiellement de l'alcool butylique, et voilà pourquoi cet agent avait (*loc. cit.*) reçu le nom de *Gr. butylicum.* Plus tard nous avons reconnu que la masse contenait surtout de l'alcool propylique.

fourni des cultures où manquaient il est vrai les caractères extérieurs de la fermentation butyrique et propyl-butylique, mais où nous trouvions au microscope un petit nombre de bacilles et de clostridies que nous devions considérer comme agents de cette fermentation, et précisément dans ces expériences où nous observions en même temps une croissance particulièrement vive de *Chroococcum* et *Radiobacter* nous obtenions un rendement d'azote très élevé (Epr. 15 et 17).

S'il s'est produit une forte fermentation butyrique dans ce genre d'expériences, une gouttelette de la culture, introduite dans la chambre de verre [1]) pour l'observation de la ligne de respiration, donne un résultat très convaincant, d'une part par la formation d'une ligne d'accumulation, particulièrement nette, des bâtonnets microaérophiles très mobiles, à une distance considérable du ménisque, d'autre part par la croissance très forte de *Chroococcum* dans le ménisque même, aux dépens de la combinaison d'azote formée par le ferment butyrique. Quand on a affaire à une culture du ferment butylique anaérobie, l'expérience ne réussit pas du tout avec la même élégance.

Comme les ferments butyriques et butyliques observés dans nos expériences présentaient des différences considérables, il n'est pas impossible que les variétés rencontrées ici se comportent autrement que celles rencontrées ailleurs.

Avant de terminer ces considérations, nous désirons encore faire remarqer que, dans les accumulations où du terreau frais avait servi à l'infection, de sorte que toutes les bactéries capables de se développer avaient pu se multiplier dans nos liquides nourriciers, nous avons observé le phénomène suivant. Dans la culture aérobie il arrive souvent que toute la masse, abandonnée à elle-même sans être remuée et maintenue au-dessous de 28° C., finit par se »gélatiniser« complètement par suite d'une formation abondante de mucus sous l'influence de *Chroococcum* [2]). Ce mucus a deux propriétés remarquables. Mélangé avec le réactif de Nessler, il commence par le jaunir; ensuite la coloration change en noir par la séparation de mercure métallique, ce qui prouve une action réductrice. En second lieu il est capable d'entrer en fermen-

---

[1]) Notre chambre de verre se distingue de celle décrite précédemment en ce que la préparation est appliquée contre la face inférieure du porte-objet, qui doit donc être aussi mince que le couvre objet lui-même; le couvre-objet ne tombe pas en vertu de la capillarité. L'installation est la suivante: une petite cuvette rectangulaire, de 6 cm. sur 4, et de 1 cm. de profondeur, peut être complètement fermée au moyen d'une plaque de verre de l'épaisseur d'un couvre-objet. La gouttelette destinée à la culture ou à l'observation microscopique adhère à la face inférieure de cette plaque et est recouverte par un grand couvre-objet ordinaire, de telle manière toutefois qu'il reste, par l'intermédiaire d'un fil de platine, un espace en forme de coin entre le mince porte-objet et le couvre-objet qui y adhère (ainsi que je l'ai représenté dans *Centralbl. f. Bact.* Bd. IV, 1893, p. 827). Dans cet espace les microbes s'accumulent, soit par déplacement, soit par multiplication, à l'endroit où la tension de l'oxygène est la plus convenable pour l'espèce considérée. La cuvette contient un peu d'eau afin d'eviter l'évaporation de la gouttelette d'épreuve, et la chambre toute entière est à son tour placée dans une autre cuvette, contenant également de l'eau. Une pareille culture peut, sans se dessécher, être observée durant des semaines et des mois. On peut se procurer l'appareil complet chez M. J. W. Giltay, fabricant d'instruments scientifiques à Delft.

[2]) Ce mucus se compose (aini que je l'ai fait voir dans ces *Archives*, (2), 7, 209, 1902) des membranes cellulaires, fortement épaissies, de cette espèce. Un mucus, en apparence tout à fait semblable, peut être formé dans nos solutions nutritives par *B. radicicola* et *Radiobacter*, mais les propriétés chimiques en sont autres.

tation butyrique et alors la masse gélatinisée se liquéfie complètement avec formation de gaz. Comme la cellulose ne subit pas la fermentation butyrique, mais bien la pectine de la membrane cellulaire, nous sommes tentés de conclure que le mucus de *Chroococcum* est formé par cette dernière substance. Il est aisé de démontrer que dans la liquéfaction, sous l'action du ferment butyrique, de la couche de pectine de la paroi cellulaire ordinaire chez les plantes supérieures agit un enzyme spécifique, secrété par ce ferment, la pectinase. Il n'est pas impossible que ce soit le même enzyme qui agisse dans notre cas sur le mucus de *Chroococcum* et en provoque la liquéfaction.

---

2. Gain d'azote dans les accumulations grossières de Chroococcum.

Pour le dosage de l'azote nous nous sommes servis de la méthode de Kjeldahl, avec la modification qu'y a apportée M. Jodlbauer[1]), en vue des traces de nitrates introduites dans mainte expérience par l'infection au moyen de terreau.

Afin d'obtenir une masse bien appropriée à la combustion dans l'acide sulfurique, nous avons précipité la culture de bactéries à l'aide de quelques gouttes d'acétate basique de plomb et nous avons filtré; nous avons ensuite sêché et brûlé le précipite avec le filtre et nous avons jeté le filtrat.

Nous avons cependant reconnu que nous perdions de cette façon une petite quantité de l'azote fixé, de sorte que nos résultats sont tous un peu plus faibles que les gains réels; la différence est toutefois peu considérable, et nous gagnions beaucoup de temps en évitant l'évaporation dans le vide.

La donnée indiquée par »Blanco« dans le tableau suivant indique la correction qu'il fallait apporter par suite de la teneur en azote des réactifs employés dans l'analyse: de l'acide phénolsulfurique, de la poussière de zinc, du mercure, de la soude caustique et de l'acide sulfurique. Il y avait aussi une correction due à la teneur en azote des fitres, de la terre et de l'eau, éléments qui tous ont été analysés plus d'une fois. En multipliant par 1,4 les dixièmes de centimètres cubes d'acide sulfurique normal, on trouve le poids correspondant d'azote en milligrammes. Dans la terre dont nous nous sommes servis, stérilisée et privée d'air, il y avait ainsi $4 \times 1,4 = 5,6$ mgr. *N* par gramme, notre eau de conduite 0,42 mgr. *N* par litre, notre mannite, 2,8 mgr. par gramme, tandis que notre saccharose et notre glucose étaient exempts d'azote.

---

[1]) *Nederlandsche Staatscourant*, 1899, n°. 277. On brûle le filtre sec avec 15 cm³. d'acide phénolsulfurique (100 p. de phénol + 900 SO^4H^2 de 1,8). Au bout de quelque temps on ajoute encore 2 gr. de poussière de zinc, 2 cm³. d'acide sulfurique concentré et une goutte de *Hg* d'environ 1 gr. On abandonne pendant quelque temps avant de passer à la combustion, afin d'éviter une formation de mousse. La combustion au bain de sable dure de 4 à 5 heures. — On lave la masse dans un ballon d'un litre de capacité, on y ajoute 125 p. de soude caustique (500 gr. $NaHO$ + 10 gr. Na^2S par litre) et en outre 25 cm³. de Na^2S (250 gr. de Na^2S par litre); on distille enfin avec 2 morceaux de zinc et on récolte le destillat dans $\frac{N}{10} SO^4H^2$.

	$cm^3. \frac{N}{10} SO^4 H^2$		Différence.	Différence diminuée de Blanco.
	Avant la distillation.	Après la distillation.		
Blanco	20,6	19,9	0,7	0,0
Terreau, 1 gr.	20,6	15,9	4,7	4,0
Terreau, 1 gr.	20,6	15,9	4,7	4,0
2 Filtres, 3 gr.	20,6	19,2	1,4	0,7
Eau de conduite, 1 l. . . .	20,6	19,6	1,0	0,3
Mannite, 2 gr.	20,6	19,7	0,9	0,2
Saccharose, 2 gr.	20,6	19,9	0,7	0,0
Glucose, 2 gr.	20,6	19,9	0,7	0,0

Nous allons maintenant donner d'abord, sous forme de tableau, un aperçu des rendements d'azote fournis par les accumulations grossières, cultivées au moins pendant 24 heures à 28° C. et puis à 23—25° C.

Afin d'examiner si, à la fin de l'expérience, il restait encore du glucose ou de la mannite, nous avons opéré comme suit:

Glucose. Dans un mince tube à réaction on verse un peu de bleu de méthylène et de potasse caustique et on fait bouillir, puis on introduit au fond du liquide bouillant, au moyen d'un tube de verre, quelques gouttes de la solution à examiner; s'il reste encore du glucose, le bleu de méthylène se décolore immédiatement par réduction.

Mannite. On laisse s'évaporer sur un porte-objet une goutte du liquide à examiner. S'il contient encore de la mannite, on voit se former au bord de la goutte un anneau blanc caractéristique d'aiguilles cristallines.

La présence *d' acide lactique* était décelée par la belle réaction au moyen d'yttrium de M. le Prof. H. Behrens. A cet effet on extrait l'acide en secouant le liquide en présence d'éther, puis on évapore l'éther dans un verre de montre, on neutralise à l'ammoniaque et on ajoute une petite quantité d'un sel d'yttrium; l'acide lactique se précipite alors sous forme de microsphérites de lactate d'yttrium, fortement biréfringents et très caractéristiques.

Dans ces expériences la fermentation butyrique était presque ou tout à fait impossible, mais il se pourrait qu'il eût existé des organismes anaérobies, à l'état de germes isolés, dans toutes les expériences avec les accumulations grossières; dans quelques-unes d'entr'elles même en grandes quantités. Il est toutefois bien difficile de les distinguer, au microscope ou par culture, de *Polymyxa, Reptans* et *Sphaericum,* car il faut pour cela que les anaérobies soient excessivement nombreux. Dans toutes ces expériences l'azote était surtout fixé sous forme d'albumine bactérienne dans les cellules de *Chroococcum,* car, bien que les cellules de *Granulobacter* et *Radiobacter* soient relativement beaucoup plus riches en albumine que celles de *Chroococcum,* leur nombre est cependant beaucoup trop restreint, pour l'emporter dans l'ensemble.

(Voir le tableau aux pages suivantes).

Gain d'azote dans les accumulations grossières.

Liquide de culture n°. 1: Eau de conduite 100
K^2HPO^4 0,05
Mannite 2

Liquide de culture n°. 2: Eau de conduite 100
K^2HPO^4 0,05
Glucose 2

No. de l'expérience et durée de la culture.	Nombre de jours.	Liquide de culture.	Matière d'infection.	cm³. $\frac{N}{10}SO^4H^2$		Différence et correction.	Différence corrigée.	Rendement d'azote en mgr.			Remarques.
				Avant la distillation.	Après la distillation.			trouvé	par litre	par gramme de glucose ou de mannite.	
1. 1 à 9 mai.	8	No. 1, 300 cm³. 1 gr. de terre sèche.	Du terreau frais produisant Chroococcum impur.	20,6	3,7	16,9 Blanco 0,7 Eau 0,1 Mannite 0,6 Terre 4 Filtre 0,35 5,75	11,15	15,61	51,98	2,60	Formation d'alcool propylique.
2. 20 sept. à 1 nov.	41	N°. 1. 300 cm³.	Chroococcum impur, transporté deux fois.	22,7	14,5	8,2 Blanco 0,7 Eau 0,1 Mannite 0,6 Filtre 0,35 1,75	6,45	9,03	30,07	1,55	
3. 30 sept. à 1 nov.	41	No. 1, 300 cm³. Craie 6 gr. (sans azote).	Chroococcum impur, transporté trois fois.	22,7	16,0	6,7 Corr. comme au n°. 2 1,75	4,95	6,93	23,08	1,15	
4. 9 au 14 nov.	5	No. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté six fois.	20,6	11,7	8,9 Blanco 0,7 Eau 0,1 Mannite 0,6 Terre 2,— Filtre 0,35 3,75	5,15	7,21	24,01	1,21	Pas de dégagement de gaz.
5. 9 au 14 nov.	5	No. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté six fois.	20,6	13,2	7,4 Corr. comme au n°. 4 3,75	3,65	5,11	17,01	0,85	Peu de gaz.
6. 9 au 16 nov.	7	No. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 6 fois.	20,6	11,3	9,3 Corr. comme au n°. 4 3,75	5,55	7,77	25,87	1,29	Beaucoup de gaz.

7. 23 nov. au 1er déc.	8	No. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 17 fois.	30,9	11,4	19,5 Corr. comme au nº. 4	3,75	15,75	22,05	73,42	3,67	Beaucoup de gaz, pas d'alcool butylique.
8. 23 nov. 1er déc.	8	No. 2, 500 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 17 fois.	30,9	9,8	21,1 Blanco Eau Glucose Terre Filtre	 0,7 0,1 0,3 2 0,35 3,45	17,65	24,71	82,28	4,12	Beaucoup de gaz, pas d'alcool butylique.
9. 23 nov. au 5 déc.	12	No. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 17 fois.	30,9	17,4	13,5 Corr. comme au nº. 4	3,75	9,75	13,65	45,45	2,27	Beaucoup de gaz, pas d'alcool butylique.
10. 28 nov. au 4 déc.	6	No. 2, 150 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 20 fois.	30,9	12,8	18,1 Blanco Eau Glucose Terre Filtre	 0,7 0,04 0,15 2 0,35 3,24	14,86	20,80	138,52	6,93	Beaucoup de gaz, pas d'alcool butylique, glucose a disparu.
11. 28. nov. au 4 déc.	6	No. 2, 150 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 20 fois.	30,9	13,1	17,8 Corr. comme au nº. 10	3,24	14,56	20,38	135,73	6,79	Beaucoup de gaz, pas trace d'alcool butylique, glucose encore présent.
12. 28. nov. au 10 déc.	12	No. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 21 fois.	30,9	17,2	13,7 Blanco Eau Mannite Terre Filtre	 0,7 0,06 0,4 2 0,35 3,51	10,19	14,26	71,30	3,56	Beaucoup de gaz, pas d'alcool butylique.
13. 30 nov. au 6 déc.	6	No. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur.	30,9	16,0	14,9 Blanco Eau Glucose Terre Filtre	 0,7 0,06 0,2 2 0,35 3,31	11,59	16,22	81,10	4,05	Peu de gaz, pas d'alcool butylique.

Gain d'azote dans les accumulations grossières.

No. de l'expérience et durée de la culture.	Nombre de jours.	Liquide de culture.	Matière d'infection.	cm.³ $\frac{N}{10} SO^4H^2$ Avant la distillation.	cm.³ $\frac{N}{10} SO^4H^2$ Après la distillation.	Différence et correction.	Différence corrigée.	Rendement d'azote en mgr. trouvé	Rendement d'azote en mgr. par litre	Rendement d'azote en mgr. par gramme de glucose ou de mannite.	Remarques.
14. 8 au 30 déc.	12	No. 2, 200 cm³.	Chroococcum impur, transporté d'une culture au glucose.	20,6	17,2	3,4 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Filtre 0,35 1,31	2,09	2,92	14,60	0,73	Formation d'acide lactique par *Aërogenes*.
15. 7 au 16 janv.	9	No. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 1 fois.	30,8	11,4	19,4 Corr. comme au no. 12 3,51	15,89	22,24	111,20	5,56	Glucose a disparu.
16. 7 au 30 janv.	21	No. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Terreau frais.	20,8	14,1	6,7 Corr. comme au no. 12 3,51	3,19	4,46	22,30	1,12	Mannite pas totalement transformée.
17. 16 au 30 janv.	14	No. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum impur, transporté 2 fois.	20,8	7,8	13,0 Corr. comme au no. 12 3,51	9,49	13,28	66,43	3,57	Mannite a disparu.
18. 6 févr. au 14 mars.	36	No. 2, 200 cm³.	Chroococcum impur, transporté 34 fois dans no. 1.	20,8	8,6	12,2 Blanco 0,7 Eau 0,6 Glucose 0,2 Filtre 0,35 1,31	10,89	15,24	76,20	3,81	Glucose a disparu.
19. 10 au 20 mai.	10	Eau 300 Saccharose 6 K^2HPO^4 0,15	Chroococcum + terreau pasteurisé + Radicicola (trèfle rouge).	30,9	26,4	4,5 Blanco 0,7 Eau 1 Saccharose 0 Filtre 0,15 1,15	3,35	4,69	15,61	0,78	Formation d'alcool propylique.

Au sujet de la façon dont les expériences ont été faites nous ferons encore les remarques suivantes:

Pour l'expérience initiale nous avons pris comme matière d'infection du terreau frais. Les cultures grossières ainsi obtenues contenaient le *Chroococcum* en abondance et servaient pour les inoculations. En répétant les transports nous obtenions toute une série de cultures, dont chacune pouvait servir comme point de départ à plusieurs séries parallèles. La petite quantité de terreau desséché, qui fut remplacé plus tard par du terreau stérilisé, servait partout de nourriture azotée, ce qui accélérait le développement des cultures. Nous introduisions ainsi, comme on voit, d'ordinaire environ 3 mgr. N dans 200 à 300 cm ^{3}. de liquide nourricier.

Voici maintenant le résumé des résultats obtenus par les déterminations d'azote dans les cultures grossières:

En employant du terreau comme matière d'infection, nous n'avons jamais obtenu des cultures grossières, assimilant l'azote, où le *Chroococcum* n'a pas pu être reconnu. Il est vrai que le temps au bout duquel le développement de cette bactérie était reconnaissable était très variable, mais nous avons toujours observé que, aussi longtemps que ce développement n'avait pas encore commencé, il n'était question ni d'une forte croissance des bactéries concomitantes, ni d'assimilation d'azote.

Quand cette espèce avait fait par hasard défaut dans la matière d'infection, nous n'observions pas de croissance notable dans la solution nourricière à mannite, que nous employions de préférence; l'addition d'une culture pure suffisait alors pour mettre en train la croissance des autres bactéries et l'absorption d'azote.

Les plus hauts rendements d'azote que nous ayons pu atteindre ont été obtenus dans de pareilles cultures grossières, p. ex. dans les épreuves 8, 10 et 11 faites en novembre et décembre 1901. Comme matière d'infection avaient servi le 17e et le 20e transport de notre série principale dans une solution à mannite. Le liquide nourricier ne contenait toutefois pas de la mannite mais du glucose. Déjà au bout de 6 jours le sucre avait disparu et la quantité d'azote, fixée dans les expériences, était de 6,93 à 6,79 mgr. par gr. de sucre ou 138,6 à 135,8 mgr. par litre de liquide de culture. Ces quantités sont plus que le double des plus grands nombres trouvés par M. Winogradsky dans ses fermentations butyriques, qui ne dépassaient pas 3 mgr. d'azote par gramme de sucre. En outre nos cultures ont une durée beaucoup plus courte. Dans ces expériences il n'y avait pas plus de fermentation butyrique que de fermentation propyl-butylique. Il est néanmoins probable qu'il existait dans les cultures beaucoup de bacilles de ces fermentations et que ces organismes prenaient une part active à la fixation d'azote. Leur présence n'était toutefois pas indispensable, puisque la combinaison *Radiobacter* + *Chroococcum* est suffisante pour la fixation d'azote et que dans beaucoup d'épreuves cette combinaison existait certainement seule. Dans ces cultures, comme dans les cultures très productives en azote en général (mais pas sans exception), il se produit un assez fort dégagement de gaz, occasionné par diverses formes d'*Aërobacter,* dont trois ont été découvertes dans les cas considérés. Ainsi qu'il a été dit au § 1, deux d'entr'elles produisaient un acide, la troisième un alcali. Par l'analyse microscopique nous avons reconnu que la masse principale des bactéries était constituée en majeure parti par *Chroococcum,* en second lieu par *Radiobacter* et en troisième lieu par ces formes d'*Aërobacter.*

Quoiqu'il mérite mention que surtout les bâtonnets et les clostridies des ferments

butyriques et butyliques contiennent beaucoup d'albumine et possèdent une membrane de mucus beaucoup plus mince que les cellules de *Chroococcum* et de *Radiobacter*, c'est à peine si dans l'analyse les espèces de *Granulobacter* viennent en considération. Nous ne voulons pas prétendre par là que ces organismes soient sans importance pour la fixation d'azote dans les cultures grossières. Tout au contraire, il est certain que même un nombre restreint d'individus de *Granulobacter* est très actif à ce point de vue, notamment par formation d'une combinaison azotée au moyen d'azote libre, combinaison que le *Chroococcum* transforme encore dans la suite. Mais c'est là une toute autre question que celle de savoir d'où provient en définitive l'albumine bactérienne trouvée par l'analyse. D'ailleurs, comme nous l'avons déjà dit, le *Granulobacter* peut faire complètement défaut dans ces cultures.

Le tableau fait voir que malgré l'emploi d'une matière infectante apparement semblable, et dans des conditions nutritives certainement identiques, le résultat des épreuves est néanmoins très variable; c'est ce que l'on remarque surtout quand on compare entr'elles les cultures 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 17 et 18, toutes prises à notre série principale et transportées de la façon décrite. Cela doit évidemment être attribué à des circonstances dont il est bien difficile de se rendre maître dans les expériences, et qui proviennent d'une part du nombre relatif de germes, semés par hasard, et des diverses espèces existant dans les cultures, d'autre part de l'état particulier d'accomodation de ces espèces. L'expérience 14 prouve que, dès que *Aërogenes* se multiplie notablement, la formation d'acide lactique entraîne une forte diminution de l'assimilation d'azote.

On voit dans l'épreuve 19 que l'addition de *Radicicola* du trèfle rouge ne suffisait pas à elle seule pour garantir un résultat favorable.

Nous croyons du reste que la description des expériences dans le tableau est suffisamment claire et que des considérations générales plus étendues sont inutiles.

---

3. Gain d'azote dans les cultures »partiellement grossières«.

Nous désirons nous occuper maintenant des rendements d'azote obtenus dans les cultures que nous avons qualifiées de »partiellement grossières«.

Ce sont des cultures où nous n'avons pas semé le mélange complet de bactéries existant dans la terre fraîche, mais seulement les formes sporogènes, restant vivantes après un chauffage de 5 minutes à 85° C., auxquelles on peut d'ailleurs ajouter encore quelques formes déterminées non sporogènes.

(Voir le tableau aux pages suivantes).

On voit d'après ce tableau que, conformément aux données de M. Winogradsky, nos cultures ont prouvé à l'évidence que la présence d'espèces non sporogènes n'est pas absolument nécessaire pour la fixation d'azote (Epr. 20, 22, 23). Toutefois, quand nous ajoutions *Radiobacter* au terreau pasteurisé, le résultat s'améliorait quantitativement dans certains cas (Epr. 28), et restait défavorable dans d'autres (Epr. 29). Mais quand nous semions le *Chroococcum* en même temps que du terreau pasteurisé, les résultats devenaient décidément plus favorables (Epr. 21, 25,

26, 30) et comparables à ceux des meilleures cultures grossières, bien que nous n'ayons jamais pu réaliser les plus hauts rendements obtenus avec ces dernières.

En présence de craie et par infection avec de la terre pasteurisée le glucose entre très facilement en fermentation butyrique; dans notre solution nourricière n°. 2 cette fermentation est accompagnée d'une fixation d'azote. On ne comprend pas très bien pourquoi les nombres obtenus dans ces expériences (Epr. 20, 22 et 23) sont si faibles. Ni une modification dans l'aération ni l'emploi de saccharose, de lévulose ou de mannite n'améliorèrent ces résultats. Le rendement d'azote s'élevait il est vrai quand la fermentation butyrique avait commencé, en présence de *Radiobacter,* mais elle n'a jamais atteint le maximum que nous nous attendions à observer.

La grande importance de *Chroococcum* pour cette série aussi se reconnaît p. ex. quand on compare entr'elles les expériences 21 et 22, dont la première, dans laquelle cette espèce était introduite en même temps que du terreau pasteurisé, donna 4,93 mgr. d'azote fixé par gramme de sucre, tandis que les spores obtenues par la pasteurisation du terreau, où le *Chroococcum* faisait donc défaut, ne produisaient que 1,6 mgr. L'expérience 22 prouve en outre qu'il ne s'agit pas ici d'une diminution de l'accommodation des ferments, puisque le terreau pasteurisé, employé tout seul, donc sans symbiose avec *Chroococcum,* ne produisait que 0,17 mgr. pendant le même nombre de jours de culture que dans l'expérience 21. Les résultats avantageux que l'on peut obtenir par ces cultures partiellement grossières dans le glucose, contrairement aux cultures complètement grossières de la série précédente, doivent être expliqués par cette circonstance que beaucoup de bactéries contenues dans le terreau non pasteurisé transforment le glucose en acide; tel est notamment le cas pour toutes les *Fluorescentes,* aussi bien celles qui liquéfient que celles qui liquéfient pas la gélatine, tandis que dans les cultures partiellement grossières cette formation d'acide, si pernicieuse pour la fixation d'azote, n'est à redouter principalement que de la part du ferment butyrique; toutes les autres espèces sporogènes ne sont que faiblement productrices d'acide. On sait que de la craie, même très finement divisée, ne neutralise qu'assez difficilement les acides dans les solutions nourricières, et l'influence favorable de *Chroococcum* réside sans aucun doute en partie dans sa forte action oxydante sur les acides organiques, et d'autre part dans son pouvoir de former en toutes circonstances un alcali.

Dans de nombreuses expériences avec plusieurs espèces d'autres bactéries, nous ne sommes pas parvenus à remplacer cette influence favorable de *Chroococcum* (et *Radiobacter),* pas plus dans les solutions à mannite que dans celles à glucose. Nous avons essayé *Aërogenes, Coli,* les *Fluorescentes, Prodigiosus* et *Radicicola,* soit séparément, soit combinées entr'elles de diverses façons ou avec du terreau pasteurisé, le tout en vain. Nous basant sur la relation de parenté entre *Radiobacter* et *Radicicola,* nous croyons cependant que surtout cette dernière espèce devrait être en état de remplir le même rôle, si la culture en laboratoire ne la mettait pas dans des circonstances anormales.

Aux expériences remarquables de cette série appartient 26, où les seules bactéries qui accompagnaient *Chroococcum* étaient des espèces qui restent vivantes dans l'eau de conduite soumise à l'ébullition. Nous avons obtenu plus d'une fois de pareilles cultures. Au microscope on n'y reconnaît, à côté de beaucoup de *Chroococcum,* que des bâtonnets qui permettent aisément une culture aérobie sur des plaques d'agar au

Gain d'azote dans les cultures »partiellement grossières«.

Liquide de culture n°. 1: Eau de conduite 100, Mannite 2, K^2HPO^4 0,05 — Liquide de culture n°. 2: Eau de conduite 100, Glucose 2, K^2HPO^4 0,05

No. de l'expérience et durée de la culture.	Nombre de jours.	Liquide de culture.	Matière d'infection.	cm³. $\frac{N}{10}SO^4H^2$ Avant la distillation.	cm³. $\frac{N}{10}SO^4H^2$ Après la distillation.	Différence et correction.	Différence corrigée.	Rendement d'azote en mgr. trouvé	Rendement d'azote en mgr. par litre	Rendement d'azote en mgr. par gramme de glucose ou de mannite.	Remarques.
20. 7 déc. au 16 janv.	20	N°. 1, 200 cm³. Craie 4 gr.	Terreau pasteurisé.	20,8	18.4	2,4 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Filtre 0,35 Craie 0 1,3r	2,09	1,24	6,20	0,31	Formation d'acide butyrique. Reste de mannite.
21. 8 au 22 avril.	14	N°. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr. Craie 2 gr.	Chroococ.+terreau pasteurisé d'une pelouse.	20,6	3,2	17,4 Blanco 0,9 Glucose 0,2 Eau 0,06 Terreau 2 Filtre 0,35 3,31	14,09	19,72	98,60	4,93	Glucose a disparu. Ni acide butyrique ni alcool propylique ou butylique.
22. 8 au 23 avril.	15	N°. 2. 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr. Craie 2 gr.	Terreau pasteurisé d'une pelouse.	20,6	15,8	3,8 Corr. comme au n°. 21 3,31	0,49	0,68	3,40	0,17	Glucose a disparu. Acide butyrique.
23. 14 au 23 avril.	9	N°. 9, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr. Craie 2 gr.	Matière du n°. 21 pasteurisée.	20,6	12,7	7,9 Corr comme au n°. 21 3,31	4,59	6,42	32,10	1,60	Glucose a disparu. Acide butyrique.
24. 20 sept. au 1er nov.	41	N°. 1, 300 cm³.	Chroococ. + ferment butyrique de 20.	22,7	16,2	6,5 Blanco 0,7 Eau 0,1 Mannite 0,6 Filtre 0.35 1,75	4,75	6,65	22,14	1,11	

25. 20 sept. au 1er nov.	41	No. 1, 300 cm³. Craie 6 gr.	Chroococ. + ferment butyrique de 22.	22,7	16,1	6,6 Corr. comme au no. 2 1,75	4,85	6,79	22,61	1,13	Mannite n'a pas complètement disparu.
26. 20 déc. au 10 janv.	21	No. 2, 200 cm³.	Chroococ. + infection spontanée du liquide bouilli.	20,8	9,5	11,3 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Filtre 0,35 1,31	9,99	13,98	69,90	3,49	Mannite a disparu; pas d'acide butyrique.
27. 27 déc. au 16. janv.	20	No. 1, 200 cm³.	Chroococ. + ferment butyrique de 25.	20,8	17,9	2,9 Blanco 0,7 Eau 0,06 Mannite 0,04 Filtre 0,35 1,51	1,39	1,94	9,70	0,48	Mannite n'a pas complètement disparu, traces d'acide butyrique.
28. 17 janv. au 7 févr.	21	No. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr. Craie 0,5 gr.	Radiobacter + terreau pasteurisé.	20,8	12,2	8.6 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Terreau 2 Filtre 0,35 3,31	5,29	7,40	37,03	1,85	Glucose a disparu.
29. 17. janv. au 7 févr.	21	No. 1, 100 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Radiobacter + terreau pasteurisé.	20,8	15,8	5,0 Blanco 0,7 Eau 0,06 Mannite 0,4 Terreau 2 Filtre 0,35 3,51	1,49	2,08	10,40	0,52	Mannite incomplètement transformée.
30. 27. janv. au 14 mars.	46	No. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococ. + terreau pasteurisé.	20,8	6,9	13,9 Corr. comme au no 29 3,51	10,39	14.54	72,70	3,63	Mannite incomplètement transformée. Formation d'acide butyrique.

glucose à 28° C. Les colonies que l'on obtient ainsi appartiennent pour la plupart à *Granulobacter polymyxa,* et parmi elles on remarque la bactérie ordinaire de la pomme de terre, *Bacillus mesentericus vulgatus,* ainsi que des états intermédiaires entre cette espèce et le *Gr. polymyxa.* En un seul cas nous avons pu y reconnaître une colonie de *Sphaericum.* Le rendement d'azote obtenu dans cette expérience, 3,49 mgr., peut être considéré comme bon. Déjà après le premier transport de pareilles cultures grossières dans la même solution nourricière, le rendement d'azote s'abaissait et devenait, par transports répétés, égal à celui que l'on obtient par des cultures combinées de *Chroococcum* + *Polymyxa* ou *Chr.* + *Sphaericum* (Epr. 51 et 52). Cette perte graduelle du pouvoir d'assimiler l'azote libre va, ici comme toujours, de pair avec la diminution de la microaérophilie chez ces espèces, propriété avec laquelle cette fonction varie pour ainsi dire proportionellement.

Pour de plus amples détails nous renvoyons encore une fois à la description des expériences dans le tableau.

---

4. Gain d'azote dans les cultures dites »alternantes«.

Nous donnons le nom de »cultures alternantes« à un genre spécial de nos cultures partiellement grossières. Ce sont des cultures obtenues par transport dans des solutions nourricières où une nourriture différente fait se développer une autre combinaison microbienne que celle qui avait été introduite. Après un nombre de transports suffisants dans les nouvelles conditions, la combinaison est transplantée une dernière fois dans la solution primitive. Dans le cas spécial où nous avons appliqué cette méthode, nous avions en vue d'éloigner les organismes anaérobies peut-être encore inconnus. Il est vrai que nous avions déjà tâché d'atteindre ce résultat en traçant, au moyen des cultures grossières, des traits inoculatoires sur des plaques d'agar au glucose, et en d'écoupant de ces plaques des mélanges de colonies qui paraissaient convenir pour le but proposé, mais nous n'étions pas arrivés de cette manière à un résultat absolument convaincant. Nous avions notamment constaté que le transport direct d'une culture grossière donnait toujours un résultat beaucoup plus satisfaisant que l'infection du liquide nourricier au moyen de fragments de la plaque d'agar, même quand nous employions à cet effet le trait tout entier, c. à d. non seulement les colonies mais aussi les espaces intermédiaires. Nous croyions d'abord devoir admettre que nous avions tué par la culture, au contact de l'air libre, une bactérie anaérobie indispensable pour la fixation intensive d'azote. Mais plus tard nous avons compris qu'il ne s'agissait pas ici d'une élimination d'organismes anaérobies, mais d'une diminution de la microaérophilie de toutes les formes fixant l'azote. Par l'étude de *Gr. sphaericum* aussi bien que de *Gr. reptans* il était en effet établi, comme nous l'avons déjà fait observer, que du moins chez ces espèces-là la propriété de fixer l'azote libre diminue par une culture aérobie; nous étions donc en droit d'attendre la même chose des symbiontes non sporogènes, spécialement de *Radiobacter.*

C'est pourquoi nous avons essayé d'atteindre cette élimination de toutes les formes de *Granulobacter,* aussi bien anaérobies qu'aérobies, sans faire usage d'un terrain nourricier solide, notamment par transport d'une culture grossière avec mannite dans

une solution où puisse se produire, il est vrai, une vigoureuse croissance de *Chroococcum,* de sorte que l'oxygène disparaîtrait pour la plus grande partie, mais qui ne contienne pas de sucre, afin d'exclure le développement de *Granulobacter.* Pour atteindre ce but, des sels d'acides organiques ont été reconnus la source de carbone la plus appropriée. Il est vrai que dans les circonstances choisies il ne se fixe pas d'azote du tout, mais l'expérience a appris que cette fonction peut être temporairement suspendue sans pour cela disparaître pour toujours dans les inoculations ultérieures. Nous avons employé p. ex. la solution suivante:

Eau de conduite	100
Acétate de sodium	0,5
K^2HPO^4	0,05
Terreau frais	2

Le terreau sert de source d'azote, indispensable dans ces expériences parce que, comme nous l'avons dit, il n'y a pas d'assimilation d'azote libre dans une solution d'acétate de sodium. La culture a lieu à 25° et la pellicule bactérienne qui se forme, constituée principalement par du *Chroococcum,* est transportée dans une solution nutritive semblable, mais préalablement stérilisée. Ces inoculations sont répétées jusqu'à ce que l'on ait obtenu l'élimination des *Granulobacter,* qui ne sont pas capables de vivre ou de concourir dans la solution d'acétate; puis on transplante de nouveau dans la solution de sucre.

Voici un aperçu d'une pareille expérience:

Durée de la culture.	Liquide de culture.	cm³. $\frac{N}{10} SO^4H^2$		Différence et correction.	Différence corrigée.	Rendement d'azote en milligrammes.		
		Avant la distillat.	Après la distillat.			trouvé.	par litre.	par gramme de mannite.
11 fév. au 14 mars =31 jours.	Eau 200 ? Mannite 4 K^2HOP^4 0,1 Terreau (stérile) 0,5	20,8	5,4	15,4 Blanco 0,7 Filtre 0,35 Mannite 0,4 Terreau 2 3,5	11,9	16,6	83,0	4,16

La mannite avait complètement disparu sans qu'on eût observé des phénomènes de fermentation, et dans l'examen microscopique aussi bien que bactériologique nous n'avons trouvé que des formes aspores, dont la plus petite partie était *Aërogenes,* le reste contenant, outre le *Chroococcum,* plusieurs variétés de *Radiobacter;* il n'y avait certainement pas de *Granulobacter.* La quantité d'azote fixée était néanmoins considérable. Nous nous croyons donc en droit de conclure que ce procédé constitue un moyen, non seulement pour écarter certains groupes de bactéries avec des propriétés physiologiques déterminées, mais encore pour conserver tout à fait invariables, au moins à travers toute la série de transports nécessaires pour la purification, les espèces capables d'assimiler l'azote.

5. Gain d'azote dans les cultures pures et les cultures combinées d'espèces bien connues de bactéries aérobies.

Nous réunissons dans ce groupe toutes les expériences qui se rapportent à des espèces isolées et à des combinaisons d'espèces différentes en culture pure.

Nous avons établi tout d'abord qu'à lui seul *Chroococcum,* placé dans nos solutions nourricières, n'est pas capable de fixer l'azote libre (comme dans les exp. 31*a* et 31*b*), ou ne l'assimile (comme dans 31*c*) qu'en quantités tellement minimes qu'il n'est pas possible d'y attacher beaucoup d'importance. Quand nous avons reconnu plus tard que ces mêmes cultures, quand on y introduit des spores de *Granulobacter,* provenant soit de l'air soit du liquide de culture imparfaitement stérilisé, fixent l'azote en quantités considérables et que même un nombre relativement restreint de bâtonnets de *Granulobacter,* difficilement reconnaissables, est encore efficace, nous avons cru pendant longtemps devoir admettre que, dans toutes les cultures combinées de *Chroococcum* avec des espèces non sporogènes, qui se montraient accumulatrices d'azote, il devait être entré, sans qu'on s'en soit aperçu, des germes de *Granulobacter.*

Mais, par l'accroissement de nos connaissances sur ce sujet, nous avons reconnu que cette manière de voir était trop étroite et qu'il doit certainement exister des bactéries, aérobies et sans spores, complètement différentes de *Granulobacter,* capables de fixer l'azote libre en symbiose avec *Chroococcum.* Ces espèces, dont nous avons considéré *Radiobacter* et *Aërogenes* de plus près au § 1, et que nous avons citées en traitant des cultures alternantes, sont moins spécialisées que *Granulobacter* dans leurs conditions nutritives; contrairement à ce dernier genre, elles peuvent, p. ex. se nourrir parfaitement de sels d'acides organiques, particulièrement de malates, citrates et succinates, mais avec ces espèces il ne se produit de fixation d'azote qu'en présence d'un sucre comme source de carbone [1]). Cette dernière circonstance doit probablement être attribuée à cette autre que chez ces espèces aussi la microaérophilie n'est possible qu'en présence d'un sucre, et il semble que la microaérophilie soit toujours la condition indispensable pour l'assimilation de l'azote libre.

Des cultures pures à considérer en premier lieu, dont celles avec *Chroococcum* (3l*a*, 3l*b*, 3l*c*) ont déjà été suffisamment discutées, quelques-unes seulement (Epr. 32 à 35) ont été notées dans le tableau, parce que des nombreuses expériences faites à ce sujet la plupart donnaient déjà au premier coup d'oeil la conviction qu'aucune fixation d'azote n'y pouvait avoir eu lieu, puisqu'il n'y avait pas eu de croissance; aussi ces cultures n'ont-elles pas été analysées. Il peut toutefois arriver aussi que, sans assimilation notable d'azote, il se forme une si grande quantité de mucus qu'on se trompe au sujet de l'intensité du premier phénomène et qu'une analyse semble nécessaire, et inversement une culture combinée avec une croissance faible en apparence peut cependant, dans certaines circonstances, donner lieu à une assimilation d'azote. Voilà comment nous avons été conduits à examiner aussi les cultures pures d'*Aërogenes, Coli, Radiobacter* et des granulobactéries *Mucosum, Reptans, Sphaericum* et

[1]) Dans les derniers temps nous avons reconnu que les lactates, les malates, l'amidon et la cellulose suffisent, dans ces conditions et en l'absence complète des *Granulobacter,* à la fixation de l'azote libre. Nous reviendrons plus tard sur ce fait important.

Tenax, le tout avec un résultat négatif, il est vrai; aussi ces expériences n'ont-elles pas été reprises. Pour le *Granulobacter polymyxa* nous avons pu faire voir que cette espèce peut se développer toute seule, sans azote combiné, dans des conditions encore imparfaitement déterminées. L'expérience qui a fourni ce résultat a été faite au moyen d'une solution nourricière au glucose; mais nous avons perdu la culture et un nouvel essai est resté infructueux. Nous avons d'ailleurs assez de raisons pour admettre que nos autres granulobactéries *Reptans, Mucosum, Tenax* et *Sphaericum* sont également en état d'assimiler tout seuls, dans des conditions convenables, l'azote libre de l'air.

(Voir le tableau aux pages suivantes.)

Il est remarquable que dans un cas déterminé (Epr. 33), notamment avec le champignon de la pomme de terre *(B. mesentericus vulgatus),* nous ayons obtenu un résultat positif au moyen d'une culture pure, mais cette propriété spécifique avait déjà disparu après le premier transport et nous ne l'avons plus retrouvée dans d'autres isolations [1]). Il est néanmoins probable que cette espèce, par suite de son ubiquité générale, ait quelque importance au point de vue de l'accumulation d'azote dans la nature.

Si nous passons aux cultures combinées, nous devons faire remarquer en premier lieu qu'en l'absence de *Chroococcum* elles donnent un résultat douteux ou décidément négatif. Telles sont les expériences avec *Mesentericus vulgatus* + *Radiobacter* (Epr. 34), *Sphaericum* + *Radiobacter, Sphaericum* + *Radicicola, Reptans* + *Radiobacter, Reptans* + *Radicicola, Mesentericus* + *Radicicola, Mesentericus* + *Fluorescens* et *Subtilis* en diverses combinaisons.

Comme nous avons des motifs pour admettre que dans des conditions déterminées, même en culture pure, toutes les formes de *Granulobacter* peuvent assimiler l'azote libre, ces expériences avec résultat négatif ne peuvent encore être considérées comme convaincantes; nous concluons plutôt à un état insuffisant d'accomodation dans tous les cas où des *Granulobacter* faisaient partie des combinaisons.

Nous sommes arrivés maintenant à l'examen de celles des combinaisons dont *Chroococcum* fait partie et nous y observons souvent, comme avec les cultures grossières, une accumulation fort notable d'azote. Ce sont surtout les combinaisons avec *Reptans* et *Sphaericum* qui sont remarquables. Nous y avons observé notamment les faits suivants. Il se peut, et tel est le cas pour les cultures les plus productives, p. ex. pour les épreuves 49 et 50 que le *Chroococcum* ne remplisse dans la matière soumise à l'analyse qu'un rôle tout à fait secondaire, et que cette matière soit constituée presque entièrement par des bâtonnets, clostridies et spores de *Sphaericum* ou *Reptans*

---

[1]) La forme employée ici a été isolée du terreau de jardin par l'expérience suivante: quand on infecte au moyen de ce terreau des plaques de pommes de terre vivantes, à l'air libre et à une température inférieure à 25° C. on ne voit rien s'y développer. Mais à 37° C. il se développe sur le tissu vivant 3 espèces de bactéries, savoir: toujours *B. mesentericus* et *B. subtilis* et rarement *Granulobacter polymyxa.* Ces circonstances nous fournissent une bonne diagnose pour les formes de ce groupe. A l'abri de l'air et à des températures inférieures à 25° C. il peut se développer aussi, sur des pommes de terre vivantes, 2 formes anaérobies qui produisent ce qu'on appelle la »putréfaction humide«, c. à d. la fermentation pectique.

Gain d'azote dans les cultures pures et les cultures combinées d'espèces connues.

Liquide de culture n°. 1:			Liquide de culture n°. 2:		
	Eau de conduite	100		Eau de conduite	100
	K^2HPO^4	0,05		K^2HPO^4	0,05
	Mannite	2		Glucose	2

No. de l'expérience et durée.	Nombre de jours.	Liquide de culture.	Matière d'infection.	cm³. $\frac{N}{10}$ SO^4H^2		Différence et correction	Différence corrigée.	Gain d'azote en mgr.			Remarques.
				Avant la distillation.	Après la distillation.			trouvé	par litre	par gramme de glucose ou de mannite.	
31*a*. 17 janv. au 7 févr.	21	N°. 1, 100 cm³.	Chroococcum.	20,8	19,2	1,6 Blanco 0,7 Eau 0,06 Mannite 0,4 Filtre 0,35 1,51	0,09	0	0	0	Encore beaucoup de mannite.
31*b*. 20 dec. au 14 mars.	84	N°. 1, 200 cm³.	Chroococcum.	20,8	19,4	1,4 Corr. comme au n°. 27 1,51	0	0	0	0	Encore beaucoup de mannite.
31*c*. 20 déc. au 16 janv.	27	N°. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum.	20,8	16,9	3,9 Blanco 0,7 Eau 0,06 Mannite 0,4 Terreau 2 Filtre 0,35 3,51	0,39	0,54	2,70	0,13	Mannite pas entièrement décomposée.
31*d*. 12 au 18 déc.	6	N°. 2, 200 cm³.	Chroococcum.	20,6	18,5	2,1 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Filtre 0,35 1,31	0,79	1,10	5,50	0,27	Rien que Chroococcum.

32. 26 déc. au 10 janv.	15	No. 2, 200 cm³. mais 1°/o de glucose.	Mesentericus vulgatus.	20,8	19,5	1,3 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,1 Filtre 0,35 1,21	0,09	0	0	0	Glucose pas entièrement décomposé.
33. 26. déc. au 10 janv.	15	No. 2, 200 cm³.	Mesentericus vulgatus, isolé de pommes de terre vivantes.	20,8	17,6	3,2 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Filtre 0,35 1,31	1,89	2,64	13,20	0,66	Glucose pas entièrement décomposé.
34. 14. janv. au 5 févr.	22	No. 2, 200 cm³.	Mesentericus vulgatus + Radiobacter.	20,8	19,5	1,3 Corr. comme au no. 33 1,31	0	0	0	0	Encore beaucoup de glucose, très mucilagineux, faible formation d'acide.
35. 1. janv. au 11 févr.	42	No. 2, 200 cm³.	Mesentericus vulgatus + Radiobacter.	20,8	19,5	1,3 Corr. comme au no. 33 1,31	0,19	0,26	1,30	0,06	Encore beaucoup de glucose.
36. 17 déc. au 10 janv.	23	No. 1, 200 cm³.	Chroococcum + Aërogenes 1.	20,8	17,6	3,2 Corr. comme au no. 27 1,51	1,69	2,36	11,83	0,59	Mannite pas encore complètement transformée.
37. 18 déc. au 10 janv.	22	No. 1, 200 cm³.	Chroococcum + Aërogenes 2.	20,8	17,2	3,6 Corr. comme au no. 27 1,51	2,09	2,92	14,60	0,73	Mannite pas encore entièrement transformée.

Gain d'azote dans les cultures combinées d'espèces connues.

No. de l'expérience et durée.	Nombre de jours.	Liquide de culture	Matière d'infection.	cm³. $\frac{N}{10} SO^4H^2$		Différence et correction.	Différence corrigéa.	Gain d'azote en mgr.			Remarques.
				Avant la distillation.	Après la distillation.			trouvé	par litre	par gramme de glucose ou de mannite	
38. 18 déc. au 10 janv.	22	No. 1, 200 cm³. mais 1 °/o de mannite.	Chroococcum + Aërogenes 2.	20,8	18,3	2,5 Blanco 0,7 Eau 0,06 Mannite 0,2 Filtre 0,35 1,31	1,19	1,66	8,30	0,83	Mannite pas encore entièrement transformée.
39. 27 mars au 18. avril.	21	No. 1, 200 cm³, Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Radiobacter.	20,6	12,1	3,5 Blanco 0,7 Mannite 0,4 Eau 0,06 Terreau 2 Filtre 0,35 3,51	4,99	6,98	34,90	1,74	Mannite pas complètement transformée.
40. 24 janv. au 6 févr.	12	Eau de conduite 200 K^2HPO^4 0,100 Saccharose 4	Chroococcum + Radiobacter.	20,8	19,6	1,2 Blanco 0,7 Eau 0,06 Saccharose 0,0 Filtre 0,35 1,11	0,09	0	0	0	Il reste encore beaucoup de saccharose.
41. 6 févr. au 14 mars.	36	No 2, 200 cm³.	Chroococcum + Radiobacter.	20,8	18,3	2,5 Corr. comme au nº. 33 1,31	1,19	1,66	8,30	0,41	Glucose pas complètement décomposé. Beaucoup de mucus formé.
42. 6 fevr. au 14 mars.	36	No. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Radiobacter.	20,8	6.5	14,3 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Terreau 2 Filtre 0,35 3,31	10,99	15,38	76,90	3,84	Glucose pas totalement transformé. Pas de mucus.
43. 11 févr. au 14 mars.	31	No. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Radiobacter.	20,8	5,9	14,9 Corr. comme au nº. 29 3,51	11,39	15,94	79,70	3,98	Mannite pas complétement décomposée.

44. 11 févr. au 14 mars	31	N°. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Radiobacter.	20,8	6,1	14,7 Corr. comme au n°. 42 3,31	11,39	15,94	79,70	3,98	Glucose pas entièrement décomposé.
45. 17 déc. au 16 janv.	24	N°. 2, 200 cm³.	Chroococcum + Polymyxa.	20,8	18,7	2,1 Corr. comme au n°. 33 1,31	0,79	1,10	5,50	0,27	Glucose pas entièrement décomposé.
46. 11 janv. au 14 mars.	62	N°. 2, 200 cm³	Chroococcum + Mesentericus vulgatus.	20,8	18,5	2,3 Corr. comme au n°. 33 1,31	0,99	1,38	6,90	0,34	Encore beaucoup de glucose, faible croissance.
47. 7 au 18 déc.	11	N°. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Mucosum.	20,6	9,9	10,7 Blanco 0,7 Eau 0,1 Mannite 0,6 Terreau 2 Filtre 0,35 3,75	6,95	9,73	32,41	1,62	Chroococcum et beaucoup de spores de Granulobacter.
48. 7 au 18 déc.	11	N°. 1, 300 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Tenax.	20,6	10,4	10,2 Corr. comme au n°. 47 3,75	6,45	9,03	30,06	1,50	Chroococcum et beaucoup de spores de Granulobacter.
49. 24 avril au 6 mai.	12	N°. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Reptans (fraîchement isolé).	20,6	2,4	18,2 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Filtre 0,35 Terreau 2 3,31	14,89	20,84	104,2	5,91	Chroococcum et beaucoup de spores de Granulobacter.
50. 30 nov. au 21 déc.	21	N°. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Sphaericum (fraîchement isolé). Craie 1 gr.	20,6	5,4	15,2 Corr. comme au n°. 29 3,51	11,69	16,36	81,80	4,09	Peu de Chroococcum et beaucoup de spores de Granulobacter; la mannite a disparu.
51. 18 déc. au 16 janv.	29	N°. 1, 200 cm³. mais 1°/o de mannite.	Chroococcum + Sphaericum (isolé depuis longtemps).	20,8	18,5	5,1 Corr. comme au n°. 38 1,31	0,99	1,38	6,90	0,69	Mannite pas totalement décomposée.
52. 18 déc. au 10 janv.	23	N°. 1, 200 cm³.	Chroococcum + Sphaericum (isolé depuis moins longtemps).	20,8	15,7	5,1 Corr. comme au n°. 27 1,51	3,59	5,02	25,10	1,25	Mannite pas totalement decomposée.

Gain d'azote dans les cultures combinées d'espèces connues.

No. de l'expérience et durée.	Nombre de jours.	Liquide de culture.	Matière d'infection.	cm³. $\frac{N}{10} SO^4H^2$ Avant la distillation.	cm³. $\frac{N}{10} SO^4H^2$ Après la distillation.	Différence et correction.	Différence corrigée.	Gain d'azote en mgr. trouvé	Gain d'azote en mgr. par litre	Gain d'azote en mgr. par gramme de glucose ou de mannite.	Remarques.
53. 29 déc. au 10 janv.	12	N°. 2, 200 cm³.	Chroococcum + Reptans + Radiobacter.	20,8	15,8	5,0 Corr. comme au n°. 33 1,31	3,69	5,16	25,80	1,29	Glucose incomplétement transformé.
54. 2 au 10 janv.	8	N°. 2, 200 cm³. Terreau stérilisé 1 gr.	Chroococcum + Reptans + Radiobacter.	20,8	10,2	10,6 Blanco 0,7 Eau 0,06 Glucose 0,2 Terreau 4 Filtre 0,35 = 5,31	5,29	7,40	37,00	1,85	Glucose incomplètement transformé.
55. 17 déc. au 16 janv.	30	N°. 1, 200 cm³.	Chroococcum + Aërogenes 2 + Polymyxa.	20,8	19,0	1,8 Corr. comme au n°. 27 1,51	0,29	0,40	2,00	0,10	Mannite incomplètement décomposée.
56. 12 déc. au 5 févr.	54	N°. 2, 200 cm³.	Chroococcum + Aërogenes + Sphaericum.	20,8	15,9	4,9 Corr. comme au n°. 33 1,31	3,59	5,02	25,10	1,25	Il reste encore beaucoup de glucose.
57. 18 déc. au 10 janv.	22	N°. 1, 200 cm³.	Chroococcum + Aërogenes 2 + Sphaericum.	20,8	17,5	3,3 Corr. comme au n°. 27 1,51	1,79	2,50	12,50	0,62	Mannite pas totalement transformée.
58. 18 déc. au 10 janv.	22	N°. 1, 200 cm³.	Chroococcum + Aërogenes 2 + Sphaericum.	20,8	17,2	3,6 Corr. comme au n°. 27 1,51	2,09	2,92	14,60	0,73	Mannite pas totalement transformée.
59. 14 janv. au 5 févr.	22	N°. 2, 200 cm³.	Chroococcum + Mesentericus vulgatus + Radiobacter.	20,8	18,6	2,2 Corr. comme au n°. 33 1,31	0,89	1,24	6,20	0,31	Glucose incomplètement transformé; beaucoup de mucus.
60. 17 janv. au 7 févr.	21	N°. 1, 200 cm³. Terreau stérilisé 0,5 gr.	Chroococcum + Aërogenes + Radiobacter.	20,8	16,1	4,7 Corr. comme au n°. 29 3,51	1,19	1,66	8,30	0,41	Encore beaucoup de mannite.
61. 6 févr. au 14 mars.	36	N°. 2, 200 cm³.	Chroococcum + Mesentericus vulgatus + Radiobacter.	20,8	17,6	3,2 Corr. comme au n°. 33 1,31	1,89	2,64	13,20	0,66	Glucose pas totalement décomposé; abondante formation de mucus.

même. Une pareille éventualité nous donne la conviction que, dans des conditions convenables, ces dernières bactéries doivent être en état de croître et de fixer l'azote à elles-seules, donc sans symbiose avec *Chroococcum*, un fait sur lequel nous avons déjà attiré l'attention en parlant des cultures pures.

Nous ne nous figurons pas encore clairement quelle circonstance spécifique cela exige. Pour la bonne réussite d'une pareille expérience, les espèces citées doivent certainement se trouver dans un état particulier d'accomodation, en rapport avec leur microaérophilie. Il est d'ailleurs remarquable que toutes les cultures combinées de *Chroococcum* avec des formes de *Granulobacter* ont donné lieu à une assimilation d'azote plus ou moins intense, indépendamment de la présence d'autres bactéries concomitantes, de sorte que la grande importance de ces combinaisons pour le phénomène en question est mise absolument hors de doute.

Nous avons en outre acquis la conviction que la combinaison *Chroococcum* + *Aërogenes* (Epr. 36 et 37) aussi peut donner lieu à une assimilation d'azote, faible il est vrai, mais incontestable.

Pour les résultats remarquables, quoique pas tout à fait compréhensibles, obtenus avec la combinaison *Chroococcum* + *Radiobacter*, nous recommandons d'examiner les expériences 39 à 44. L'examen complet de notre tableau fait voir d'ailleurs que le pouvoir d'assimilation présente, dans les cultures combinées, un caractère beaucoup plus variable encore que dans les cultures grossières, ce qui s'explique par le rapport qui existe entre cette fonction et la microaérophilie, avec laquelle elle augmente ou diminue, en ce sens que l'état »anaérobie« des bactéries concomitantes serait la condition pour obtenir le rendement d'azote le plus élevé. Nous avons notamment pu prouver, ainsi que nous l'avons déjà fait remarquer maintes fois, que dans les cultures aérobies sur plaques, surtout avec des espèces de *Granulobacter*, le besoin d'oxygène augmente, c. à d. que la microaérophilie diminue, et en même temps le pouvoir d'assimiler l'azote doit diminuer. La culture sur plaques, base de toutes ces expériences, est donc préjudiciable pour l'assimilation d'azote au point de vue quantitatif, ainsi qu'on le reconnaît le mieux en comparant l'expérience productive 50 avec l'expérience 51, très peu productive; on voit par là combien l'activité de *Sphaericum* est diminuée par culture à l'air libre. On constate quelque chose d'analogue avec *Reptans*, d'après les expériences 53 et 54 d'une part et 49 d'autre part.

Nous avons enfin à parler de ces groupes de cultures combinées où nous avons employé, à côté de *Chroococcum*, deux autres espèces encore. En comparant les résultats de ces expériences (53 à 61), on voit immédiatement qu'elles n'ont rien appris de particulier. Nous sommes revenus néanmoins plus d'une fois à ce genre d'expériences, d'une part parce que nous espérions arriver ainsi à une combinaison par laquelle il serait possible de fixer tout autant d'azote que dans les cultures grossières, et d'autre part parce que ces cultures produisent une quantité de mucus si considérable, que nous croyions pouvoir nous attendre à un fort rendement d'albumine, jusqu'à ce que l'analyse nous apprit que nous étions trompés. Bien que dans plusieurs de ces expériences la durée de la culture ait été trop courte pour que nous eussions atteint le rendement maximum d'azote, il ne nous est pas possible de bien expliquer comment ce rendement est si faible; ici aussi nous songeons à une accomodation insuffisante des bactéries soumises à l'expérience aux conditions nutritives dans lesquelles elles ont été placées.

Pour le reste, dans ce cas aussi nous croyons que nous avons donné dans le tableau précédent assez de détails des expériences pour pouvoir nous abstenir de plus amples développements.

---

6. Expériences sur la nitrification de l'azote libre.

Une solution composée de 100 p. d'eau de la distribution, 1 de glucose et 0,05 de K^2HPO^4 fut infectée le 23 déc. 1901 avec le 26e transport de notre culture grossière à mannite. Par comparaison avec des cultures parallèles nous avons constaté que le 23 janv. 1902 il y était déjà fixé 70 mgr. d'azote libre par litre, en même temps qu'il s'était formé une épais mucus de *Chroococcum,* à réaction très faiblement alcaline. L'azote devait avoir été fixé en majeure partie sous forme de protoplasme du *Chroococcum* lui-même. Le 23 janv. nous y avons introduit un peu de terreau frais, d'une part pour ajouter des bactéries capables de transformer l'albumine de *Chroococcum* en sel d'ammonium, et en second lieu pour introduire les ferments de la nitrification. Après 3 semaines nous avons distinctement pu constater la formation de nitrite et vers le milieu de mars 1902 nous n'y trouvions plus de nitrite, mais seulement du nitrate en grande quantité. Par voie colorimétrique, au moyen de la réaction de diphénylamine et acide sulfurique, nous avons trouvé que le filtrat du liquide contenait en tout environ 250 mgr. de nitrate par litre (calculé comme KNO^3). Comme les 70 mgr. d'azote correspondent à 500 mgr. de KNO^3, nous voyons qu'au bout de 7 semaines la moitié à peu près de l'azote libre assimilé était nitrifié. Et comme cet azote a dû être entièrement contenu dans l'albumine de la masse bactérienne nouvellement formée, surtout dans *Chroococcum,* nous avons ainsi une mesure approchée de la vitesse avec laquelle se nitrifie l'azote, présent dans le corps de *Chroococcum* à l'état d'albumine.

Nous avons repris ces expériences plus d'une fois et toujours avec le même résultat.

En les effectuant, il est recommandable de ne pas se fier exclusivement à la réaction qualitative au moyen de diphénylamine et d'acide sulfurique, mais d'opérer quantitativement comme nous l'avons décrit, et cela pour la raison suivante:

Quand on introduit du terreau frais, sans plus, dans l'eau de la distribution, la réaction par diphénylamine et acide sulfurique ne réussit pas au commencement, même quand on mélange 5 à 10 gr. de terreau avec 50 cm³. d'eau. Et cependant ce terreau contient des substances capables d'être nitrifiées après dilution avec de l'eau et par aération, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter des sels ou d'autres substances. Au bout de quelques jours la réaction à la diphénylamine + acide sulfurique est positive, indépendamment de l'azote atmosphérique fixé ou non fixé.

Mais nous avons trouvé que 0,5 gr. de terreau dans 50 cm³. constituait la limite de sensibilité de la réaction, car en employant moins de terreau encore, il n'y avait plus moyen de découvrir du nitrate ou du nitrite. Si l'on a donc employé pour l'expérience en question plus de 50 cm³. d'eau et moins de 0,5 gr. de terreau pour l'infection, un résultat positif de la réaction qualitative susdite prouve déjà, sans aucune determination quantitative, que de l'azote atmosphérique a été nitrifié [1]).

---

[1]) *Notice historique.* Après la publication du travail sur l'oligonitrophilie (voir ces *Archives,* (2), 8, 190, 1903), dont la communication à l'Académie des Sciences d'Amster-

7. Résumé et conclusion.

Il y a deux procédés importants pour obtenir des accumulations d'organismes oligonitrophiles, conduisant à des cultures de bactéries qui fixent énergiquement l'azote libre de l'atmosphère; d'abord, le procédé de culture complètement grossière, ensuite, le procédé de culture partiellement grossière.

Une *culture complètement grossière* s'effectue comme suit: On introduit 100 p. d'eau de conduite, contenant 2 p. de mannite et 0,05 de K^2HPO^4, en couche peu profonde dans un large flacon d'Erlenmeyer, on infecte au moyen de terreau frais et on cultive entre 23 et 28° C. Déjà au troisième jour commence une culture de bactéries où *Chroococcum* est prépondérant. Après quelques transports la plupart des impuretés ont disparu, mais il reste toujours quelques *Fluorescentes*, qui ne produisent pas d'acide dans la solution de mannite. Si l'on inocule cette culture dans 100 p. d'eau de conduite, 2 de glucose et 0,05 de K^2HPO^4, on obtient la combinaison *Chroococcum* + *Granulobacter* (sous diverses formes) + *Radiobacter*, qui donne lieu au rendement d'azote le plus élevé que l'on ait atteint jusqu'ici, savoir 7 mgr. d'azote fixé par gr. de sucre assimilé. Il n'y a pas moyen de répéter les transports dans la même solution au glucose, par suite de la formation d'acide par les *Fluorescentes*, ce qui entrave la croissance.

Mais, si l'on transporte alors dans une solution à mannite, ou si l'on suit la méthode de culture »alternante«, en employant passagèrement l'acétate de chaux comme source de carbone, — nourriture qui ne convient pas aux *Granulobacter*, — on arrive enfin, avec la mannite, à la combinaison des deux espèces non sporogènes *Chroococcum* + *Radiobacter*, par laquelle peuvent être fixés, dans la solution à mannite, environ 4 mgr. d'azote par gramme de mannite assimilé. Dans cette culture les *Granulobacter* font défaut, mais on y trouve encore des *Fluorescentes*, ainsi qu'une petite quantité d'*Aërogenes* et *Coli*.

Le procédé de *culture partiellement grossière* est le suivant: On prend une so-

---

dam date du 30 mars et du 25 mai 1901, M. le Dr. W. Krüger de Halle a. S., dans une lettre du 6 sept. 1901, a attiré notre attention sur le passage suivant d'un travail qu'il avait publié dans *Landwirtschaftl. Jahrb.* 1900, p. 701: »Hier mag zunächst noch ein Versuch kundgegeben werden, der dafür Zeugnis ablegt, dass unter denselben Verhältnissen, unter welchen wir die Algen züchteten« (le travail de M. Krüger traite notamment la question de savoir si les algues à chlorophylle inférieures sont en état d'assimiler l'azote libre, dont la réponse est négative) »bei Organismen welchen das Vermögen eigen ist, sich des freien Stickstoffs der Luft als Stickstoffquellen zu bedienen, Stikkstoffaufnahme aus der Atmosphäre stattfindet. Von mehreren Versuchen sei hier das Ergebnis eines derselben mit einem aus dem Boden gezüchteten Organismus angeführt. Dazu wurde wieder eine Nährlösung ohne Zusatz von Stickstoffverbindungen, die pro 100 ccm. nur 0,0003 g. Stickstoff enthielt, verwendet.« .... Au bout de 62 jours il constate dans 100 cm^3. une augmentation de 4,6 mgr., dans 200 cm^3. 6,8 mgr. et dans 300 cm^3. 8,5 mgr. d'azote fixé. M. Krüger continue en ces termes: »Es wurden also nicht unbeträchtliche Mengen von elementarem Stickstoff assimiliert und die Entwicklung der Kulturen machte keineswegs den Eindruck, dass dem Organismen irgend ein wichtiger Nährstoff nicht zu Gebote stand.« L'organisme dont il est question ici était *Chroococcum*, ainsi que nous avons pu nous en assurer à l'aide d'un tube de culture que M. Krüger nous envoya en même temps que sa lettre; la culture n'était toutefois pas pure, mais un mélange complexe de microbes.

lution de 100 p. d'eau de conduite, 2 de mannite et 0,05 de K^2HPO^4, on bien 100 d'eau, 2 de glucose, 2 de craie et 0,05 de K^2HPO^4; on infecte avec *Chroococcum* + terreau pasteurisé et on cultive de nouveau entre 23 et 28° C. Après des transports répétés on obtient une combinaison fixant de l'azote, formée de *Chroococcum* et de diverses espèces de *Granulobacter,* avec des impuretés constituées par quelques bactéries accessoires, sporogènes. Le plus haut rendement d'azote atteint dans ce genre d'expériences, savoir 5 mgr. d'azote fixé par gr. de sucre (Epr. 39), a été fourni par une combinaison de *Chroococcum* avec la bactérie aérobie, mais fortement microaérophile, *Granulobacter reptans.*

Tous les *Granulobacters* sont plus ou moins microaérophiles. On peut mesurer approximativement cette propriété en appliquant aux colonies sur agar au glucose la réaction à l'iode. On voit alors que les organismes les plus microaérophiles contiennent aussi le plus de granulose et se colorent donc en bleu intense, tandis que les individus les moins microaérophiles (donc les plus aérophiles) ne prennent qu'une teinte bleu clair [1]).

Il semble d'ailleurs que l'assimilation de l'azote libre aille de pair avec la microaérophilie chez toutes les espèces capables de remplir cette fonction. La propriété de la microaérophilie se manifeste par cette circonstance que, dans une goutte du liquide de culture, placée dans la chambre humide, il se forme, soit par croissance, soit par motilité, des accumulations non dans le ménisque même, mais à quelque distance vers l'intérieur, où l'air dissous doit avoir une tension plus faible. Cette préférance pour une basse pression de l'oxygène se perd toutefois par hérédité dans des cultures à l'air libre, du moins pour *Granulobacter,* et en même temps disparaît l'état d'accomodation nécessaire pour la fixation d'azote. Cette perte de l'état d'accomodation par culture aérobie permet d'expliquer pourquoi les combinaisons de cultures pures d'espèces connues ne peuvent donner lieu à une fixation d'azote, importante au point de vue quantitatif, que quand elles sont fraîchement isolées des cultures accumulatives grossières.

Nous sommes d'avis que le résultat principal de nos recherches est que nous avons prouvé, comme il a déjà été remarqué dans l'introduction, *que dans l'assimilation de l'azote libre par les bactéries il commence par se former une combinaison soluble, qui sort par diffusion des organismes actifs, se propage autour d'eux et est ainsi mise à la disposition d'autres microbes* [2]).

Pourquoi cette combinaison, dont la nature chimique est encore inconnue en ce moment, est si difficilement assimilable pour les bactéries qui la produisent, et si facilement au contraire pour *Chroococcum* qui s'en sert pour sa croissance, voilà un point qui n'est pas encore élucidé. Mais il faut remarquer que cette dernière espèce se conduit vis à vis des combinaisons azotées en général d'une manière exceptionelle, non seulement au point de vue de l'avidité extraordinaire avec laquelle elle extrait de la

---

[1]) Par cette simple expérience on peut obtenir des »bactéries de l'alinite«, capables d'assimiler l'azote libre, non seulement, comme l'»alinite« du commerce, dans l'imagination de l'observateur, mais en réalité. Qu'on se garde bien de confondre à ce propos la réaction bleu-violette sur la granulose des *Granulobacter* avec la réaction rouge violette sur le glycogène, si caractéristique pour le groupe *Megatherium,* non fixateur d'azote.

[2]) Ou même de végétaux supérieurs, comme c'est le cas avec *Radicicola.*

solution même les moindres traces de ces substances, mais aussi au point de vue de l'action qualitative qu'elle montre à leur égard.

Nous avons notamment reconnu que *Chroococcum* est une des rares bactéries qui engendrent directement de l'ammoniaque[1]) aux dépens de nitrates et de nitrites, et cette action de *Chroococcum* sur les nitrates peut devenir tellement intense que, dans des conditions de croissance avantageuses, il n'y a même pas moyen de prouver une formation intermédiaire de nitrite[2]). A notre connaissance, le *Chroococcum* est unique à ce point de vue.

Il est bien vrai qu'il y a encore d'autres bactéries qui forment NH^3 au moyen de nitrates et de nitrites, mais cela a lieu d'une autre manière, ainsi qu'on le reconnait au tableau suivant, où nous avons établi un parallèle entre *Chroococcum* et les bactéries *B. subtilis* et *B. mesentericus,* isolées de pommes de terre vivantes. Nous nous sommes servis des liquides nourriciers suivant:

1. Eau de conduite 100
   Malate de calcium 2
   K^2HPO^4 0,05
   KNO^3 0,05
2. Le même que 1, avec KNO^2 au lieu de KNO^3.
3. Le même que 1, avec mannite au lieu de malate de calcium.
4. Le même que 3, avec KNO^2 au lieu de KNO^3.

	Liquide de culture			
	1 *Ca Mal* KNO^3	2 *Ca Mal* KNO^2	3 Mannite KNO^3	4 Mannite KNO^2
Chroococcum	NH^3 pas de KNO^2	NH^3	NH^3 pas de KNO^2	NH^3
Mesentericus vulgatus	NH^3 et KNO^2	pas de NH^3	NH^3 et KNO^2	NH^3
Subtilis	pas de NH^3 mais uniquement KNO^2	pas de NH^3	pas de NH^3 mais uniquement KNO^2	pas de NH^3

Ainsi qu'on pouvait s'y attendre, *Granulobacter polymyxa,* avec ses variétés *Tenax* et *Mucosum,* appartient comme *Mesentericus* aux bactéries qui forment de l'ammoniaque aux dépens de nitrates et de nitrites. Pour *Sphaericum* et *Reptans* il nous a été impossible d'en fournier la preuve, probablement à cause d'un défaut dans l'expérimentation.

On voit d'après ce tableau que la formation d'ammoniaque aux dépens de KNO^2, en présence d'un malate comme source de carbone, n'a pu être démontrée que

[1]) Par contre, la formation d'ammoniaque aux dépens d'amides et d'albuminoïdes est une fonction très répandue parmi les bactéries, et bien connue par les cristaux de phosphate double d'ammonium et de magnésium qui se forment dans de vieilles cultures, de différentes espèces, sur agar ou sur gélatine.

[2]) Quand la croissance est ralentie et que les conditions vitales sont défavorables, nous avons pu constater la transformation de nitrate en nitrite même chez *Chroococcum.*

pour *Chroococcum,* mais pas chez les deux autres espèces, qui se distinguaient au contraire de *Chroococcum* par une formation abondante de nitrite.

Une dénitrification, c. à d. une séparation d'azote libre de nitrites, ne s'opère ni par *Chroococcum* ni par les deux autres espèces.

Nous avons donné ces développements sur la conduite de *Chroococcum* vis à vis des nitrates et des nitrites, parce que nous nous sommes plus d'une fois demandé si la combinaison azotée, mise en liberté par les bactéries qui fixent l'azote libre, ne serait pas un nitrite; mais nous n'avons jamais découvert de traces de nitrites dans les cultures pendant la fixation d'azote, pas plus que de l'ammoniaque en présence de *Chroococcum.* Et l'hypothèse que les nitrites se forment passagèrement, mais disparaissent immédiatement parce que *Chroococcum* les transforme en ammoniaque, et que l'ammoniaque elle-même est employée pour la croissance de l'une ou l'autre espèce de bactéries, ne satisfait pas théoriquement, parce que les *Granulobacter* qui fixent l'azote ne se nourrissent pas facilement avec leur propre produit d'assimilation, mais satisfont au contraire aisément leur besoin d'azote au moyen de nitrites.

Nous avons également considéré la possibilité de la formation d'un sel d'hydrazine ou d'hydroxylamine et nous avons essayé de les découvrir par des réactions basées sur les propriétés réductrices de ces substances, sans arriver toutefois à un résultat décisif.

Faisons encore remarquer enfin que *Chroococcum* forme de l'alcali en toutes circonstances, même en présence de glucose et d'autres espèces de sucre, ce qui est d'ailleurs aussi le cas pour *Radiobacter.*

Nos considérations, il faut l'avouer, n'expliquent rien des processus chimiques de la fixation d'azote, mais elles font connaître des faits qui peut-être faciliteront un jour une telle explication.

Nous croyons qu'il est prouvé que toutes les espèces de *Granulobacter,* tant aérobies qu'anaérobies, placées dans des circonstances avantageuses, sont capables d'employer pour leur croissance, quoique difficilement, la combinaison azotée qu'elles engendrent, et peuvent donc fixer l'azote en culture pure. M. Winogradsky l'avait déjà observé pour le ferment butyrique et nous avons pu nous convaincre de l'exactitude de son assertion, non seulement pour ce qui regarde cet organisme-là mais aussi pour le ferment butylique. Quant aux formes aérobies de ce genre, nous avons pu prouver la même propriété pour une souche de *Granulobacter polymyxa,* mais d'autres isolations n'étaient plus en état de croître, sans intervention de *Chroococcum,* dans nos liquides de culture pauvres en azote. En un seul cas une culture pure de *Bacillus mesentericus vulgatus,* isolée du terreau au moyen de tranches de pommes de terre vivantes, assimilait l'azote libre sans l'intervention d'autres bactéries, mais elle avait déjà perdu ce pouvoir après un seul transport.

Toutes nos observations prouvent qu'il existe dans le sol même et particulièrement dans le terreau une combinaison azotée, formée par les bactéries assimilatrices d'azote, qui se propage dans toutes les directions et est mise à profit par d'autres organismes pour leur nutrition azotique. Surtout *Chroococcum* paraît remplir à ce point de vue un rôle important dans le sol, et nous avons fait voir que le protoplasme de cette bactérie se transforme aisément en ammoniaque et peut être nitrifié ensuite, ce qui fait qu'il est possible de transformer en peu de temps l'azote atmosphérique libre en nitrate.

Pour expliquer l'influence extraordinairement avantageuse que *Chroococcum* exerce sur la culture artificielle, spécialement des *Granulobacter,* nous devons encore rappeler que ces dernières bactéries produisent des acides qui entravent leur développement; or, ces acides sont en partie neutralisés, en partie oxydés par *Chroococcum.*

Pour ce qui regarde *Radiobacter,* cette espèce aussi doit transformer l'azote en une combinaison qu'elle cède à son entourage et qui peut servir d'aliment azoté du moins à *Chroococcum et* certainement aussi à *Radiobacter* même, quand *Chroococcum* est présent. Les rapports entre ces deux espèces de bactéries rappellent vivement ceux qui existent entre le *Radicicola,* apparenté de près à *Radiobacter,* et les Papilionacées.

L'observation, que certaines variétés de *Radiobacter* dénitrifient énergiquement, c.àd. éliminent l'azote des nitrates et nitrites dans des conditions nutritives convenables, nous a conduit à nous demander s'il n'y aurait pas d'autres bactéries dénitrifiantes capables de fixer l'azote libre en symbiose avec *Chroococcum,* mais toutes nos expériences dans cette direction ont donné un résultat négatif.

Delft, Laboratoire de Bactériologie de l'Ecole Polytechnique.

On a colourless bacterium, whose carbon-food comes from the atmosphere.

By M. W. BEIJERINCK and A. VAN DELDEN.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. V, 1903, p. 398—413. — Verscheen onder den titel »Over een kleurlooze bacterie, waarvan het koolstofvoedsel uit de lucht komt« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel XI, 1903, blz. 450—465; en onder den titel »Ueber eine farblose Bakterie, deren Kohlenstoffnahrung aus der atmosphärischen Luft herrührt« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, X. Band, 1903, S. 33—47.

We give the name of *Bacillus oligocarbophilus* [1]) to a colourless bacterium, whose carbon nutrition in the dark (and likewise in the light), takes place at the expense of a not yet well-known atmospheric carbon compound (or compounds), from which the energy, wanted for the vital processes, is also derived [2]).

The culture of this bacterium on solid media or in nutrient solutions, containing soluble organic substances has not yet succeeded, which may, of course, have been caused by an erroneous choice of these substances. On the other hand, pure cultures on solid and in liquid substrata, without soluble carbon compounds, are easy to be made.

---

[1]) It is probable that W. Heraeus (Ueber das Verhalten der Bacterien in Brunnenwasser sowie über reducirende und oxydirende Eigenschaften der Bacterien. Zeitschrift f. Hygiene, Bd. I, pag. 226) already in 1886, has had cultures of *B. oligocarbophilus* before him. He says the following: .... »Ausserordentlich auffallend war das Ergebniss dieser Versuche in der Hinsicht, dass eine Vermehrung der Bacterien in einer Flüssigkeit eingetreten war, welche keine organische Verbindungen sondern nur Salze enthielt. Ein unansehnliches, kaum sichtbares Pünktchen von Bacterienzoogloeën hatte sich im Verlaufe von zehn Tagen so stark vermehrt, dass die ganze Oberfläche der Lösung von einer dicken Haut bedeckt war.« Analytical results are not given, and the remark makes the impression of being accidental and is lost among insignificant observations. — Winogradsky's statement, concerning the accumulation of organic carbon in nitrifying solutions, evidently refers likewise to this microbe, but his description suffers of indistinctness (Annales de l'Institut Pasteur, T. 4 pg. 270 et 462, 1891). — In the experiments of Godlewski (Bulletin international de l'Académie d. sc. de Cracovie, Dec. 1892 pag. 408 et Juin 1895 pag. 178), the vanished CO^2 is not, as he thinks, absorbed by the ferments of nitrification but by the Mg O . Mg CO^3.

[2]) We also found another, rarer species, belonging to the genus *Streptothrix* Cohn, with corresponding properties. It will not however, be further discussed here.

1. Crude cultures of bacillus oligocarbophilus.

Bacillus oligocarbophilus is obtained by the following accumulation experiment, which, because of the purity of the thereby resulting vegetation, may be called a »perfect accumulation experiment.«

Into a large Erlenmeyer-flask a thin layer is introduced of a nutrient liquid of the same composition as used for the water culture of higher and lower green plants, but with alkaline instead of acid reaction.

One takes for instance:

Distilled water	100
Kaliumnitrate	0.01 to 0.1
Dinatriumphosphate	0.02
»Mineral solution«	1 drop.

This »mineral solution« contains in one drop:

8	Mgrms	$MgSO_4 . 7 H_2O$
0.05	„	$MnSO_4 . 4 H_2O$
0.05	„	$FeCl_3 . 3 H_2O$

If from this liquid nitrogen, phosphor, kalium or magnesium is left out, special experiments have proved, that no, or but an insignificant growth is obtained. As to the necessity of the likewise added elements sulphur, manganese and iron, there still exists some doubt.

The inoculation is made with a not too small quantity of garden-soil, the flasks are closed with a cotton plug, or with filter paper, without impeding the entrance of air by diffusion, and the culture is left in the dark at 23—25° C. After two or three weeks, the fluid, which itself remains perfectly clear, is seen to cover with a thin, white, or feebly rose-coloured, very dry film, difficult to moisten, and macroscopically resembling a *Mycoderma*-film, but consisting of minute bacteria, microscopically often invisible without staining, and sticking together by a slimy substance. This is *Bacillus oligocarbophilus.*

The growth of the film continues for months, whereby a considerable accumulation of organic carbon may be observed, which is not only visible to the naked eye by the vigorous bacterial growth, but can also be proved by direct weighing, and by a comparison of the permanganate numbers found before and after the experiment, of which some instances are given below.

As there is reason to admit that our bacterium is generally distributed in garden-soil, and was without doubt always present in the crude material used for the inoculation, the failing of the film-formation in some of the flasks must necessarily result from the chosen culture fluid being less favorable to the feebler germs and not allowing their growth. So we observed that water, distilled in a copper apparatus, caused many more failures than when distilled in glass; we therefore afterwards always used the latter. In other cases monads, which immediately devoured the bacteria, were cause of the failure; by transfers and by the use of pure cultures, these voracious organisms could be rendered harmless or removed. When the distilled water is replaced by tap-water, the number of flasks remaining without growth after inoculation with the same quantity of garden-soil is much smaller.

If once a pellicle has formed, transfers into the said culture liquid, prepared either with distilled or with tap-water, come easily and without exception to development.

2. Source of nitrogen required.

In the above mentioned nutrient liquid we have chosen kaliumnitrate as source of nitrogen. As well, however, kaliumnitrite or some anorganic ammonium salt may be used. Very good results were obtained with:

Distilled water	100
Ammonium sulphate (or NH_4Cl)	0.01—0.1
Dikaliumphosphate	0.02
»Mineral solution«	1 drop

and with:

Distilled water	100
Kaliumnitrite	0.01—0.1
Dikaliumphosphate	0.02
»Mineral solution«	1 drop.

As both these liquids answer to the conditions of life of the microbes of nitrification, the formation of nitrite or nitrate is actually to be observed when using them, and when inoculating with garden-soil or with crude cultures. With the easily produced pure cultures of *B. oligocarbophilus,* of which more below, a good development of the film is possible, by which experiment it can at the same time be proved, that this microbe itself does not nitrify. Hence, ammonium salts or nitrites, added to excess can, even for a year or longer, continue unchanged under the luxuriantly growing pellicle of *B. oligocarbophilus,* whereas, in the presence of nitrifying ferments, they completely disappear in a few weeks, being then found back as nitrates. If the ferments of nitrification alone are present, there is no question of film-formation and the nutrient solutions remain perfectly clear.

Not only the nature of the nitrogen-furnishing substances, but also their quantity can in these experiments, as already inferred in the recipes, vary between fairly wide limits, and the same may be said concerning the conditions for the water culture of higher and lower green plants. The limits allowable for *B. oligocarbophilus,* have not yet been precisely fixed, but they certainly have a broader range for this organism (circa 0.1—10 pro mille) than for the higher plants (0.5—5 pro mille).

By many experiments it was established, that in absence of kalium, phosphor, and magnesium, a still slighter growth occurs, than when no nitrogen compounds are given. Evidently *B. oligocarbophilus* finds in the atmosphere, in a condition fit for nutrition, a quantity of nitrogen, which, although insufficient, should not be overlooked.

If the distilled water in the artificial solution is replaced by tap-water, a somewhat higher rate of organic substance is produced. As in tap-water a small quantity of nitrogen compounds occur, — here, at Delft, about 0.4 milligrams of combined nitrogen per litre, — whilst it contains the other necessary elements (phosphor and kalium, of course, excepted) in an obviously favorable form for the nutrition of our mikrobe, one can simply use for its culture:

Tap-water	100
Dikaliumphosphate	0.02

It should, however, be kept in view, that the productivity in bacterial substance, in consequence of the film formation, is not determined by the volume, but chiefly by the extent of the surface of the medium, which is in free contact with the air. Hence, in a very thin layer of tap-water, the nitrogen may soon be consumed, whereas, with the same amount of nutrient liquid, but with a smaller surface, consequently in a thicker layer, the provision of nitrogen will suffice for a longer time. Therefore, in order to obtain from a flask of determined size, the maximum production of *B. oligocarbophilus,* a nitrogen compound should be added when a small quantity of tap-water is used, which addition is not necessary when cultivating in a greater quantity in a flask of the same size.

3. Pure culture.

Our bacterium does not grow at all or only to a slight extent on the commonly used bacteriological media, these containing too much organic food. But it is easy to produce pure cultures on solid media, when observing the same precautions which I described in the Meeting of the Academy of 27 June 1892 for the pure culture of the ferments of nitrification on agar-plates [1]), and to which I referred in the Meetings of 30 March 1901 (Proceedings p. 586) and 25 May 1901 (Proceedings p. 5) when discussing the culture conditions of the oligonitrophilous Cyanophyceae.

In all these cases it is necessary as completely as possible to remove all soluble organic substances from the solid medium, which is to be effected by a prolonged washing with distilled water. The agar thus prepared, with the required nutrient salts, for instance in the proportion:

Distilled water	100
Agar	1.5
K_2HPO_4	0.01
KNO_3 (of NH_4Cl)	0.01

is boiled and plated, and used for strew-or streakcultures originating from a film of *B. oligocarbophilus.* Very soon the common saprophytic bacteria which never lack in the film, are seen to develop on the plate and when these by their growth and respiration have consumed the soluble carbon compounds, which were not yet removed from the agar by the extraction with water, *B. oligocarbophilus* itself begins to grow. This is usually the case after 14 days. Then, however, the colonies become easily recognisable, our bacterium being the only species which in the given circumstances can feed on the atmospheric carbon, and so go on growing, whilst the growth of all other species soon comes to a stop.

Even the colonies of the nitrifying ferments, which, as I have demonstrated before (l. c.), can grow fairly well on this medium, when instead of nitrate an ammonium salt is used, remain very small, never exceeding 1 mM. or less. On the other hand, the colonies of *B. oligocarbophilus* attain dimensions of 1 cM. and more and may then easily be transferred in a pure condition into test-tubes on the said medium. They grow on the agar as thin, snow-white or rosy-tinted, very dry, flatly extended layers, which strongly remind of the pellicle floating on the liquid.

---

[1]) Nature, Vol. 46, pag. 264, 1892.

Also on silica plates, prepared in glass dishes, which, after extraction of the chlorides are soaked with a nutrient solution, *B. oligocarbophilus* can produce very fine cultures, appearing after some weeks, as snowwhite colonies with indented margin, and which by a right selection of the salts, can finally spread over the whole plate. Then the remarkable phenomenon is observed, that the silica liquefies a little in the centre of the colonies and sinks in by evaporation.

The silica plates are made as follows. A commercial solution of potassium silicate, diluted with a known quantity of water, is titrated with normal hydrochloric acid. As the solidification is much favoured by an alkaline reaction, a complete neutralisation at the preparation of the plate should not occur, and as a plate, with a high percentage of silica, contracts strongly after coagulation, and expresses much water, the dilution must be sufficient for this contraction to be delayed. Into a small beaker-glass was introduced, in a certain case, 5 cM^3 of potassium silicate diluted with 25 cM^3 of water, and into a second glass the required quantity of hydrochloric acid, amounting to 10 cM^3 of normal acid. The acid is mixed with the diluted silicate and the mixture poured into a glass dish. The solidification delays the longer as the mass is more diluted, but it is easy, after some practice, to make very solid plates. The plate is first freed from the chlorides by streaming tap-water, then washed out with boiled water, and afterwards treated with the solution of nutrient salts. When these have sufficiently diffused into the plate, the glass dish is gently warmed at the underside, until the adhering water has evaporated and the plate shows a »dry«, glossy surface. The surface is flamed in the Bunsen-burner, by which only a partly but sufficient sterilisation is to be attained.

Not only *B. oligocarbophilus,* but also the ferments of nitrification grow on this medium very well. By mixing of the diluted solution of the silicate with chalk, magnesium carbonate, or ammonium-magnesium phosphate, snow-white plates may be obtained, which are particularly fit for the culture as well of all these microbes as of several lower algae. Even earth-diatoms, of the genus *Nitzschia* will grow thereon.

Once more it must be observed, that in the silica plates organic substances must be absent, even fragments of cork, fallen into the silicate solution, may disturb the experiment.

The pure cultures, obtained on agar or silica plates, are as well fit for the further experiments on liquid media as the crude cultures, of which many experiments, continued for years, have convinced us. Every thought of symbiotic relations on which the carbon assimilation by our bacterium might repose is thereby excluded, so that at least the biological side of this part of our problem is clear.

Concerning the further properties of our bacterium in pure cultures, we can be brief. In the films, as well as on in the colonies on the solid media, it consists of minute, thin and short rodlets, probably always immobile. They are ca. 0.5 μ wide and 0.5—4 μ long. The length however is very variable and frequently particles are seen 0.5 μ wide and 0.7—1 μ long. Often, when not using reagents, such as dyeing substances or acids, no structure at all is to be observed, neither in the colonies nor in the flowing pellicle, but the bacteria at once become visible by staining the preparations. The thick cellwalls form the chief constituent of the colonies; albuminous matter is only present in a slight quantity in this bacterium.

4. The nutrition with atmospheric carbon.

A good appreciation of the carbon accumulation may be had as well by a direct weighing as by the permanganate method.

For both determinations it is possible, to suck off the fluid, which is practically free from bacteria, wholly or partly from beneath the film, so that the quantity of the culture material, destined for the filtration or the determination of the permanganate number, is not too voluminous.

In our experiments there only resulted a precipitate of calciumphosphate or calciumcarbonate, when we had used our tap-water, which is rich in lime, and when kaliumphosphate, to excess had been added. These precipitates can, however, be dissolved beneath as well as in the film by dilute acid, and then the acid can be expelled by further washing. The film is so dry and wetted with so much difficulty, that all these manipulations may be effected without much loss of material.

The permanganate number was determined after Kubel's[1]) method.

In relation to the quantity of organic matter found by direct weighing or by the permanganate method and formed from the atmospheric carbon, the following should be well observed.

As *B. oligocarbophilus* grows only on the free surface of the medium, and not in the depth, the thickness of the layer of the nutrient solution and consequently its volume, is, as already observed, actually indifferent. That is to say, by enlarging the surface of the solution, a bacterial film of any dimensions is to be obtained, which circumstance is of importance for appreciating the productivity of a certain quantity of a nutrient solution, the more so as the thickness of the bacterial film is usually only one cell-layer. How very thin the required thickness of this layer can be, growth being still possible, may be derived from the fact, that, especially when using distilled water with nutrient salts, the film can mount at the apparently dry glass-wall from 1 to 1.5 decimeter high, and not seldom extends on it nearly to the cotton plug. Only in certain vinegar bacteria I observed the same.

As it seems that our bacterium forms no compounds prejudicial to its growth, so the only circumstance, which governs its increase relatively to a given volume of liquid, provided its surface be of a sufficient extent, is the lack of one or more elements necessary for the nutrition. Carbon cannot be among the number, our experiments being made with free entrance of air.

Although it is thus established, that only the number of bacteria, produced in a certain time per surface-unit, indicates the rate at which the atmospheric carbon is assimilated, we will yet give the quantities in relation to the volume of the solution, because then a comparison can be better made with the numbers found by other authors for polluted waters.

5. How much carbon is assimilated.

First we determined by an experiment, in which, after vigorous shaking, a culture was divided into two equal portions, how much one half contained at direct

[1]) Tiemann-Gärtner's Handbuch der Untersuchung der Wässer, 4e Aufl. pag. 255, 1895.

weighing, of bacterial substance, whereas the other half was titrated with kalium-permanganate. We used for this a three months old culture on:

Tap-water	100
Na_2HPO_4	0.02
KCl	0.02
KNO_3	0.02

The film from the part, destined for the weighing, was separated from the liquid by filtration, washed out on the filter with strongly diluted hydrochloric acid, and subsequently with distilled water, to remove the chlorids. Subsequently the filter with the film was dried, first at 40°—50° C. and then at 100° C., until the weight remained constant. So we found that per litre 180 milligrams of bacterial matter were produced, and that, after deduction of 14 milligrams, used by a litre of our tap-water itself, the corresponding permanganate number was 94. We can thus, with an accuracy sufficient for our purpose, accept that the relation between the two figures is as 2 : 1, that is to say, that the doubling of the permanganate number gives the weight of the dry bacterial substance, and, as this latter number is much more quickly to be found than the weight, we have contented ourselves with it in most our further determinations.

We shall now give some more figures. Like the preceding they all relate to bacterial films produced in Erlenmeyer-flasks on 100 cM^3. liquid with a free liquid-surface of about 80 cM^2.

By weighing we found in one case on:

Tap-water	100
KCl	0.02
KNO_2	0.02
K_2HPO_4	0.04

after 5 month's culture 235 milligrams per litre. On:

Distilled water	100
KCl	0.02
KNO_3	0.1
K_2HPO_4	0.02
»Mineral solution«	1 drop

after 5 months 220 milligrams per litre.

Some numbers, found by the permanganate method follow, and in the first place some relating to tap-water.

The greatest production which we had, was obtained with tap-water 0.02 K_2HPO_4 and 0.02 KNO_3, after a year's culture and amounted to 250 mgrs. of permanganate per litre, nearly corresponding with $250 \times 2 = 500$ milligrams of dry bacterial substance.

After a shorter time the production is likewise smaller; so we found in a culture on:

Tap water	100
Na_2HPO_4	0.02
KCl	0.02
KNO_3	0.02

after 5 month's culture (January to May) 202 mgrs. of permanganate, corresponding with 404 mgrs. of bacterial matter per litre.

If the tap-water was replaced by distilled water, the production of dry organic substance was commonly smaller, which cannot, however, result from the nutrition by substances in the tap-water, oxidisable by kaliumpermanganate, for the 14 mgrs. of permanganate, which our tap-water consumed per litre, we found quantitatively back, at the end of the cultivation period, in the clear liquid beneath the pellicle of *B. oligocarbophiles,* which liquid can easily be sucked off with a pipette, without any considerable bacterial contamination. Moreover the experiments with distilled water have likewise exhibited great divergency in production, and though the cause has not been established with perfect certainty, we still think it probable, that these differences result from the greater or smaller density of the cotton plugs, by which the speed of air entrance is greatly influenced. We base this supposition on results obtained with flasks, only differing in the width of the mouths, and to which we shall refer later. It is furthermore certain that we have not to do here with the infection of other bacteria, or with monads, for the pure cultures displayed as considerable divergency as the crude ones. Neither can the chief cause be attributed to a change in percentage of the air in gaseous carbon compounds, the differences being observed simultaneously in cultures placed side by side in the same locality.

But we now give some further numbers. In an experiment with:

Distilled water	100
K_2HPO_4	0.02
KNO_2	0.1
KCl	0.01
»Mineral solution«	1 drop

sterilised and inoculated with a pure culture of *B. oligocarbophilus,* were found, after 37 days' cultivation (2 Jan.—19 Febr.) at 23° C., 66.6 mgrs. of permanganate, corresponding with circa 133 mgrs. of dry bacterial substance per litre.

In another experiment with:

Distilled water	100
Na_2HPO_4	0.02
KNO_2	0.01
»Mineral solution«	1 drop

likewise sterilised and after a culture of 40 days, at 23° C. the permanganate number amounted to 60 mgs., corresponding with 120 mgrs. of dry bacterial matter per litre.

In a third case in:

Distilled water	100
K_2HPO_4	0.02
$(NH_4)_2SO_4$	0.02
Na_2CO_3	0.01
»Mineral solution«	2 drops

after cultivating from 5 May to 1 Dec., 155 mgrs. of permanganate per litre were found.

In a culture in:

Distilled water	100
Na_2HPO_4	0.02
KCl	0.02
KNO_3	0.02
»Mineral solution«	1 drop

from 1 June to 1 Dec. we found 165.5 mgrs. of dry bacterial substance, corresponding with ca. 83 mgrs. of permanganate per litre. As we see, the differences are considerable.

When a little natrium acetate was added to the anorganic solution, and when using a pure culture for inoculation, we could neither state an augmenting nor a diminishing of growth.

Thus we obtained in:

Distilled water	100
KCl	0.02
KNO_2	0.1
Natriumacetate	0.02
K_2HPO_4	0.02
»Mineral solution«	1 drop

by means of weighing, 220 mgrs. of dry bacterial substance per litre, corresponding with 110 mgrs. of permanganate, which figures are not exceedingly high and might likewise have been produced in the same time (4 months) from the air alone, without acetate.

In all these experiments with distilled water, the free surface of the liquid was also 80 cM^2, and the air had to pass through a dense cotton plug, with which the Erlenmeyer-flasks were closed. Already before we drew attention to the importance of the way in which the flasks are closed; be here still mentioned that we made some special experiments, which proved that a very narrow opening of the flasks, slackens the growth of *B. oligocarbophilus,* so that years may go by before the film has vigorously developed. We could not, however, expected anything else, for the considerable volume of air, required for the growth of the said quantities of bacteria, can only very slowly diffuse inward and outward through the narrow canal.

6. Carbonic acid cannot serve as food.

Various experiments were made to establish what may be the volatile atmospheric carbon compound which renders the growth of *B. oligocarbophilus* possible. That it cannot be carbonic acid, whether free or combined, resulted from the following experiments. In closed culture-flasks with the best nutrient solutions, and arranged in such a way, that at times a little free carbonic acid mixed with pure air, could artificially be introduced, it was not possible to get any growth. This experiment, which seemed of particular interest, has been so frequently repeated, and so long continued under different conditions, that we consider it as quite certain, that free carbonic acid cannot serve for the nutrition of *B. oligocarbophilus.*

For testing the influence of combined carbonic acid, cultures were made, firstly in the following solution:

Tap-water	100
Dikaliumphosphate	0.01
Kaliumnitrate	0.01
Natriumbicarbonate	0.1

When cultivating at the free air surely a luxurious growth was obtained, but it was by no means more vigorous than when the bicarbonate was left out.

If in this liquid the nitrate was replaced by an ammonium salt, the result was quite the same.

Secondly, the bicarbonate was replaced by common natrium carbonate, the same quantities of the different salts being used. But in this case the action proved rather injurious than favorable. It is true that the film had become considerable after a few months, but it was directly to be seen that the growth was so much inferior to that of cultures obtained in the same circumstances but in absence of carbonate, that the determination of the permanganate number seemed superfluous. Here, too, the replacing of nitrate by an ammonium salt or by a nitrite caused no change.

As a remarkable fact it may be mentioned, that in these experiments, in our large flasks, containing a litre of air, the thin bacterial film mounted very high up the dry glass-wall, which is likewise often observed in the solutions made with distilled water, and may repose on the absence of dissolved lime salts.

If the tap-water was substituted by distilled water, the addition of natrium carbonate did not cause an increase of bacterial growth either. We found, for instance, in:

Distilled water	100
K_2HPO_4	0.02
$(NH_4)_2SO_4$	0.02
Na_2CO_3	0.1
»Mineral solution«	1 drop

after 7 months (5 May—1 Dec.) 155 mgrs. of permanganate, corresponding with ca. 300 mgrs. of dry bacterial substance per litre, which production is less than that, obtained in other cases under the same circumstances but without carbonate, so that here also, the action of the carbonate, the long time of cultivation being taken into consideration, was not favorable. Quantities of carbonate, smaller than 0.1% were neither successful.

The results of this examination can be thus summarised, that for the growth of *B. oligocarbophilus* an atmospheric carbon compound is actually consumed, but that this cannot possibly be free carbonic acid. Furthermore, that also combined carbonic acid cannot serve for its nutrition.

7. Nature of the assimilated atmospheric carbon compound.

If the carbonic acid of the air cannot be the food of *B. oligocarbophilus*, what other atmospheric carbon source might then come into consideration?

It is clear, that we should think here of the carbon-containing component of the air, discovered in 1862 by the botanist Hermann Karsten[1]), and recently discovered anew by French experimenters, especially by Mr. Henriet[2]). It is true that the chemical nature of this substance has been hitherto unknown[3]), but yet it is

---

[1]) H. Karsten. Zur Kenntniss des Verwesungsprocesses. Poggendorff's Annalen Bd. 191, pag. 343. 1862. To this place, as also to the not unimportant older literature on the carbon compound of the air, my attention was drawn by Mr. G. van Iterson.

[2]) Comptes Rendus T. 135, pag. 89 et 101. 1902.

[3]) Henriet thinks that the substance must be a monosubstituted formamid with the formula HCO.NHR, where R represents a still unknown alkylrest. But then it is

certain that we have here to do with an easily oxidisable compound (or compounds), for a prolonged contact with alkali and air already suffice to split off carbonic acid from it. Furthermore, according to the statement of the French investigator, the substance probably contains nitrogen.

This latter circumstance gives rise to the question whether this nitrogen, like the carbon, is fit for assimilation by our microbe. Though this question has already partly been answered in the negative by the preceding experiments, it should still be remarked here that in nutrient liquids, without an expressly added nitrogen compound, for instance in:

Distilled water	100
K_2HPO_4	0.02
Mg. S, Mn, Fe	traces.

Or still better in:

Tap-water	100
K_2HPO_4	0.02

without any further addition, a not inconsiderable growth of *B. oligocarbophilus* may occur, so that at least traces of an assimilable nitrogen compound may be drawn from the air by this bacterium, whereas, for the possibility of assimilation of the free atmospheric nitrogen no indications were found.

We now turn to another question, which the assimilation of the atmosperic carbon gives rise to, namely: How great is the quantity of the volatile substance wanted for the formation of the bacterial film produced in our cultures? This question is closely connected with the following: How much of the compound is moreover consumed by the respiration of our bacterium, escaping as free carbonic acid? For answering these questions we have to measure the quantity of the carbonic acid corresponding with a determined weight of dry bacterial substance, granted that the carbon percentage of this substance be known.

Our experiments relating to the measurement of the quantity of carbonic acid produced, are not yet closed, but as to the first part of the question, we give the following calculation to fix the volume of air wanted for the production of the carbon, actually accumulated in the bacterial films. We hereby make two chemical suppositions which, to be sure, are fairly well in accordance with truth. First, we admit that the carbon, freed from the unkown compound, as carbonic acid by a prolonged contact with alkali, is consumed quantitatively by our bacterium and, secondly, that the bulk of the bacterial cells consists of a substance possessing nearly the composition of cellulose [1]).

Let us now consider the case when, in ½ litre-flask with 100 cM³. of fluid and a free surface of 80 cM², after a month's culture a quantity of 20 mgrs. of dry bacterial substance is formed, which, calculated as cellulose, contains 44% C.; we then find in the 20 mgrs. of dry matter 8.8 mgrs. of carbon. According to Henriet the atmospheric carbon compound, present in a certain quantity of air, under prolonged

not easy to understand, why the production of carbonic acid takes place so readily. It might then rather be expected that, with an alkali a formiate would result and no carbonate.

[1]) If accepting that the composition of the bacterial cells corresponds with that of albuminous substances, then, instead 44% C., 52 to 55% C. should be brought into account, and in this proportion the volume of the air should be augmented.

action of alkali, gives out as much carbonic acid as occurs already in a free state in the same volume of air, that is per litre 0.3 cM^3. = 0.6 mgrs. in which 0.163 mgrs. of carbon are pesent. Thus, for 8.8 mgrs. are wanted 55 litres of air. Consequently, in the course of a month these 55 litres of air must have diffused through the cotton plug inward and outward of our ½ litre-flasks, in order to produce the found quantity of carbon, that is 76 cM^3. hourly.

Though this figure should not be considered à priori as impossible, it still appears to be very high, and the difficulty of accepting it increases, if still the addition has to be made of a yet unknown, but apparently considerable amount consumed for the bacterial respiration, which, as remarked above, seems necessary. We therefore think that it must be admitted that the quantity of the atmospheric compound (or compounds) assimilable by *B. oligocarbophilus,* is much larger in our laboratory atmosphere, than in that of the Paris boulevard, analysed by Henriet, and that we have here to do with an extremely variable factor. The circumstance, too, that we have not as yet been able in our greenhouse, where the air, in the common sense of the word, is surely much purer than in the laboratory, to obtain a vigorous growth of *B. oligocarbophilus* pleads for this view. But here we could not always keep the temperature high enough, so that we consider our experiments in this direction not yet closed. Besides, we should observe, that in an empty, isolated room of the laboratory; the quantities of combined carbon drawn from the air, were as great, or only little less than in the laboratory itself, where the air was certainly impurer.

We are accordingly conscious that further experiments, with fresh atmospheric air are wanted to decide, whether the carbon compound occurs in the atmosphere in a constant or in a varying percentage. Only thereby it will be possible to ascertain the distribution of this compound, by which, at the same time, the signification of *B. oligocarbophilus* in nature will become clearer.

As to this signification, the question arises whether our microbe in substrata containing sufficient mineral nutrients (N, P, K, Mg, S, Fe, Mn), but being poor in organic substances, is able to build up the latter in the dark from the volatile carbon compounds occurring in the atmosphere of the surrounding medium. And furthermore, whether carbon nutrition takes place exclusively in the floating dry films, — hence, in the earth, only on the relatively dry surface of the earth particles, — or that also in the depth of fluids growth and carbon assimilation be possible. The hitherto gathered experience about the self-purification of rivers and the biological purification of water in general, seems to exclude the latter hypothesis, and our own experiments too, render it not probable. The result of these experiments consists, in our opinion, in the very discovery of a microbe, which, in consequence of the film-formation, has the specific faculty, to absorb for its nutrition and multiplication, from a gas, namely the air, traces of volatile carbon compounds, by which the struggle for existence with the rest of the microbic world can be successfully sustained. The biological purification of water would, according to this view, find a counterpart in the biological purification of the air by *Bacillus oligocarbophilus.*

Phénoménes de reduction produits par les microbes[1]).

Archives des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome IX, 1904, p. 131—157. — Verscheen onder den titel »Reductieverschijnselen door Mikroben bewerkt« in Handelingen van het 9e Nederlandsch Natuur-en Geneeskundig Congres, gehouden te 's-Gravenhage, 1903, blz. 195—218.

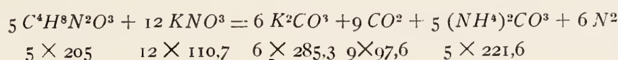
Les phénomènes de réduction produits par la vie organique reposent sur une désoxydation ou une hydrogénation. C'est ainsi que la plupart des bactéries sont capables, moyennant une nutrition intense et un libre accès de l'air, d'isoler le sélenium des sélénites et le tellure des tellurates; quels que soient les processus chimiques qui constituent cette réduction, en dernière analyse ils doivent consister en un enlèvement d'oxygène. La même remarque s'applique au pouvoir que possèdent plusieurs bactéries de transformer les nitrates en nitrites. Par contre, la transformation du lévulose $C^6H^{12}O^6$ en mannite $C^6H^{14}O^6$, qui se produit par l'action des ferments lactiques de l'industrie dans de bonnes solutions nutritives, ne peut être attribuée qu'à une addition d'hydrogène. Il en est de même du passage des sulfonates de l'indigo bleu à ceux de l'indigo blanc sous l'action de beaucoup d'espèces de bactéries, ainsi que la formation, pas moins générale, de l'acide sulfhydrique aux dépens du soufre.

Quand on essaie de classer dans un de ces deux groupes chaque cas particulier où l'on observe un phénomène de réduction, on se heurte souvent à des incertitudes, et en y regardant de plus près on reçoit l'impression que la distinction que nous venons de faire est artificielle, c. à d. que la désoxydation n'est pas à proprement parler un processus à part, mais qu'elle repose sur l'action de l'hydrogène sulfuré ou d'autres substances aisément oxydables, mises en liberté par les microbes; il se peut d'ailleurs que, comme les réductions mentionnées en second lieu, elle repose sur une addition, par les microbes, d'hydrogène à la substance cédant de l'oxygène. On ne doit toutefois pas se figurer ici la présence d'hydrogène libre; c'est plutôt de l'hydrogène impossible à déceler par voie chimique et qui reste combiné au protoplasme. Cette dernière remarque s'applique d'ailleurs aussi à la véritable hydrogénation. Ainsi, par exemple, les ferments lactiques actifs produisent beaucoup d'anhydride carbonique mais pas du tout d'hydrogène libre, ce qui n'empêche pas que ce sont eux précisément qui ajoutent de l'hydrogène au lévulose, à certains corps colorants et probablement à beaucoup d'autres substances encore. Quoi qu'il en soit, il est pratique de conserver la distinction entre les deux groupes de phénomènes de réduction.

---

[1]) Conférence avec démonstrations faite à Delft, le 16 avril 1903, à l'occasion du 9e Congrès des Naturalistes et Médecins hollandais.

Les processus de désoxydation exigent une source particulière d'énergie extérieure. A cet effet, les microbes incolores se servent de l'une ou l'autre substance organique, sur laquelle ils transportent l'oxygène qu'ils enlèvent au corps qu'ils réduisent; sauf dans le cas de la décomposition de l'anhydride carbonique, dont je parlerai plus tard, en quel cas c'est du soufre élémentaire, de l'hydrogène sulfuré etc. qui font l'office de source d'énergie. D'ordinaire cette substance organique est oxydée à l'état d'anhydride carbonique et d'eau, et même d'ammoniaque quand elle contient de l'azote. On a donc affaire ici à un phénomène de »combustion intérieure«, une forme de respiration intramoléculaire par laquelle la substance organique consommée (qui est évidemment tout à fait différente du corps plus ou moins hypothétique, agissant directement d'une manière réductrice et que nous considérerons plus loin) est oxydée comme aliment respiratoire; à cet oxygène consommé on peut donner le nom d'»oxygène d'oxydation«. Un bon exemple de ce cas, où l'azote libre est très nettement un produit de réduction, est le processus de dénitrification, caractéristique d'un assez grand nombre d'espèces de bactéries, et dont l'allure peut être représentée comme suit, si nous prenons p. ex. l'asparagine comme nourriture organique pour base:



$$5\,C^4H^8N^2O^3 + 12\,KNO^3 = 6\,K^2CO^3 + 9\,CO^2 + 5\,(NH^4)^2CO^3 + 6\,N^2$$
$$5 \times 205 \qquad 12 \times 110{,}7 \qquad 6 \times 285{,}3 \quad 9 \times 97{,}6 \qquad 5 \times 221{,}6$$

Les nombres placés sous les substances actives donnent les chaleurs de formation; la différence prouve que la transformation est exothermique, avec développement d'environ 1344,8 cal., soit 1,1 cal. pour chaque gramme de salpètre consommé.

On voit que l'oxygène libre n'intervient pas directement dans ce phénomène. Cependant les microbes qui le produisent ne sont pas véritablement anaérobies, car on peut les isoler de la manière ordinaire par culture sur plaques à l'air libre, et il n'est pas difficile de faire voir qu'en empêchant l'accès de l'oxygène libre on arrête le processus de dénitrification au bout d'un temps relativement court. L'oxygène transporté par le processus de réduction joue donc un tout autre rôle que l'oxygène libre même et n'est pas en état de le remplacer complètement. Il est nécessaire d'appliquer également cette conclusion à la respiration ordinaire, aussi bien à la respiration d'oxygène, accompagnée du développement d'anhydride carbonique, qu'à la respiration intramoléculaire proprement dite, où il ne se combine pas, il est vrai, d'oxygène que l'on peut déceler par voie chimique, mais dont il est pourtant bien prouvé qu'une réserve d'oxygène, liée au protoplasme, est nécessaire pour entretenir le processus à la longue. Ce raisonnement n'est modifié en rien par le fait, dûment constaté à ce qu'il paraît, qu'il intervient dans la respiration intramoléculaire une substance provenant de la cellule vivante, c. à d. une portion déterminée seulement du protoplasme, car l'expérience a prouvé que l'activité de cette substance est limitée et de courte durée, de sorte qu'elle a besoin d'être renouvelée pour que l'action reste continue, et c'est précisément pour ce renouvellement que la quantité excessivement petite d'oxygène »libre«, mais lié au protoplasme, sera nécessaire comme »oxygène excitateur«.

Il y a lieu, je pense, de faire remarquer ici que le double rôle, si nettement joué par l'oxygène dans les phénomènes de réduction produits par les microbes aérobies, se retrouve d'une façon correspondante chez les microbes que l'on qualifie d'»anaérobies«. Là aussi on peut faire voir, dans tous les cas connus jusqu'ici, qu'à côté de la

consommation »intramoléculaire« d'oxygène, comme *source d'énergie* pour l'oxydation de la substance organique, à laquelle peut servir par exemple l'oxygène combiné fourni par la réduction des sulfates (»oxygène d'oxydation«), une quantité très petite d'oxygène *libre* (»oxygène d'excitation«) doit toujours être fournie par le milieu ambiant. Il est vrai que cette dernière quantité est très petite et ne peut pas être décelée par voie chimique, mais *à la longue* l'absence complète d'oxygène libre arrête absolument la croissance et toute autre manifestation vitale, n'importe dans quelle classe d'organismes, donc aussi les processus de réduction, même chez les »anaérobies obligatoires«. On voit par là qu'il n'existe pas d'organismes anaérobies dans le sens strict du mot; voilà pourquoi j'ai déjà proposé à d'autres occasions de caractériser ce besoin, faible mais toujours existant, d'oxygène libre chez ces microbes par le terme »microaérophilie«.

L'expérience suivante, faite avec des bactéries phosphorescentes, prouve que des traces d'oxygène libre sont présentes même dans ces cas-là où les réactions chimiques ordinaires ne permettent pas d'en trouver, comme par exemple dans une solution saturée d'hydrogène sulfuré dans l'eau, où le bleu de méthylène et les sulfonates de l'indigo bleu son transformés en substances réduites incolores.

Un flacon bien bouché à l'émeri est rempli d'une culture de bactéries phosphorescentes, on attend jusqu'à l'obscurité complète, c. à d. jusqu'à ce que les dernières traces d'oxygène libre aient disparu. Puis on remplit une pipette de la substance que l'on veut examiner au point de vue de l'oxgène, p. ex. une solution aqueuse d'acide sulfhydrique, on ouvre le flacon et on plonge la pipette jusqu'au fond de la culture obscure. L'air entraîné par cette opération occasionne une luminescence de quelques instants. Quand elle a cessé on laisse s'écouler le liquide de la pipette et l'on observe alors un phénomène lumineux très net. Des solutions de sulfite de soude, conservées en flacons fermés, contiennent encore plus d'oxygène libre que les solutions concentrées d'hydrogène sulfuré. Par contre, on constate que les cultures des microbes aérobies et anaérobies ont la propriété d'absorber facilement les dernières traces d'oxygène libre présentes dans leurs milieux nourriciers. C'est là la raison pour laquelle les cultures des organismes anaérobies réussissent si bien d'ordinaire, quand on emploie d'autres microbes pour éliminer l'oxygène libre, de manière à ne conserver que la faible réserve d'oxygène libre, liée au protoplasme des bactéries anaérobies elles-mêmes. On voit de plus qu'il n'est pas possible de chasser des milieux nutritifs les dernières traces d'oxygène libre, même par des réactifs comme H^2S et Na^2SO^3, *sans l'intervention des microbes eux-mêmes.* Tout cela s'accorde fort bien avec la conception de la »microaérophilie«, mais pas du tout avec de l'anaérobiose obligatoire.

II. Réduction des Sélénites, Séléniates, Tellurites et Tellurates.

M. Schuerlen introduisit 0,05 à 0,1% de Na^2SeO^3 ou Na^2TeO^3 dans de la gélatine à bouillon de viande, et montra que toutes les bactéries mises à l'épreuve mettaient en liberté du sélénium rouge vif ou du tellure noir. L'expérience est basée sur le fait que les sélénites et les tellurites, contrairement aux sulfites, sont stables au contact de l'air, mais sont aisément réductibles par les bactéries. Toutes les espèces de bactéries ne présentent pas toutefois cette propriété. C'est ainsi que dans l'eau de

canal j'ai pu découvrir deux espèces dont les colonies sur plaques à sélénite ou tellurite restaient incolores.

Il est remarquable que M. Schuerlen n'ait pas examiné comment se comportent les tellurates. Contrairement aux tellurites, qui sont déjà très pernicieux à 0,05% et aux sélénites dont la mauvaise influence se fait déjà sentir à 0,1%, le K^2TeO^4, peu soluble, n'est pas vénéneux même en excès. Sa réduction est un peu difficile que celle du tellurite, mais, quand on humecte d'eau de canal une plaque de gélatine ou d'agar à bouillon de viande, contenant K^2TeO^4 en excès, on obtient au bout de quelques jours une culture où les colonies les plus fortement réductrices, comme les vibrions et les formes de coli, sont noir intense, tandis que les autres, à pouvoir réducteur moins puissant, présentent toutes les nuances entre le gris clair et le noir, et produisent ainsi une véritable échelle permettant de juger de l'intensité de la fonction réductrice. Les séléniates se décomposent beaucoup plus difficilement, ce qui n'empêche pas qu'à l'abri de l'air, p. ex. dans des tubes à réaction profonds, on puisse obtenir de belles cultures rouge foncé. Sur des plaques à Na^2SeO^4 exposées à l'air ne se colorent que quelques cultures très fortement réductrices de *Coli* et *Vibrio,* qui perdent déjà ce pouvoir par un seul transport à l'air. Mais sur un terrain solide, dans des tubes bien profonds et à l'abri de l'air, les formes de *Coli* font toujours voir la réduction des séléniates d'une façon particulièrement nette. Toutes ces expériences se prêtent très bien à des démonstrations.

III. Réduction des nitrates en nitrites et en sels ammoniacaux.

Outre le processus de dénitrification [1]) dont il a été question et dans lequel il se forme de l'azote libre aux dépens des nitrates, il peut aussi se produire une réduction de ces substances en nitrites ou en sels ammoniacaux. La formation d'un nitrite est une fonction très généralement répandue chez les bactéries, mais elle ne se présente jamais ni chez les levures ni chez les moisissures. La formation d'ammoniaque aux dépens des nitrates (et des nitrites) est un phénomène beaucoup plus rare, que l'on observe par exemple chez les bactéries dites »du foin« et chez *Azotobacter,* quand on les cultive dans les liquides contenant un nitrate et du sucre.

La formation de nitrite dans les cultures sur plaque est prouvée par l'expérience suivante, très démonstrative.

Dans la gélatine ou l'agar à bouillon destinés à la culture sur plaques on introduit 0,5% d'amidon et 0,1% de KNO^3. Dès que les colonies ou les traits commencent à se développer on y verse une solution de $IK+HCl$, et l'on voit alors les colonies qui ont formé KNO^2 s'entourer d'un champ bleu sur un fond incolore. Comme la diffusion du nitrite est rapide, la réaction doit être faite avec de jeunes cultures. Dans les expériences avec l'eau de canal, la moitié à peu près des colonies avaient formé du nitrite. Les fluorescentes ne possèdent pas cette propriété ou ne la possèdent qu'à un faible degré.

---

[1]) On trouve des détails sur la dénitrification dans Gayon et Dupetit, Réduction des nitrates par les infiniment petits, Nancy 1886, et G. van Iterson, Accumulation experiments with denitrifying bacteria, Proceed. Acad. of Science Amsterdam, vol. 5, pag. 148, 1903.

IV. Réduction de l'acide molybdique libre.

Quand on introduit de l'acide molybdique libre dans une eau de viande et qu'on l'infecte par du terreau, on voit se produire, au bout de quelque temps, une coloration bleue par la formation du molybdate de l'oxyde de molybdène; tel est d'ailleurs le cas aussi avec de l'acide phosphotungstique libre. Toutefois, comme les bactéries ne réduisent pas les sels de ces acides, pour la recherche de ces organismes cette réaction n'a pas grande valeur.

Mais il est remarquable que les ferments alcooliques, les ferments de l'acétate d'éthyle et l'*Oidium lactis* possèdent la propriété de transformer, en présence de l'air, l'acide molybdique en sel bleu (molybdate de l'oxyde de molybdène) à un degré beaucoup plus fort que les bactéries, ce qui donne lieu à l'expérience suivante.

Dans un flacon contenant une gélatine à extrait de malt, déjà refroidie mais encore liquide, on introduit une petite quantité, p. ex. 0,5% d'acide molybdique pulvérisé et sec, on agite et on déverse sans tarder en plaque. Quand on inocule par traits les espèces de microorganismes mentionées, on observe qu'au-dessous des végétations la gélatine prend, au bout de quelques jours, une couleur indigo-bleu foncée. Ici aussi il n'est pas possible d'employer les sels molybdiques: l'expérience ne réussit qu'avec l'acide molybdique libre. Les ferments lactiques et acétiques que l'on trouve en si grande quantité dans la levûre de boulanger ne donnent pas cette réaction. Ce n'est donc pas un processus de réduction ordinaire, mais il semble qu'il repose sur l'action d'un produit de secrétion encore inconnu.

V. Expériences de réduction avec des substances colorantes.

C'est un fait bien connu que des substances colorantes organiques, comme les sulfonates de l'indigo, le bleu de méthylène, le tournesol et bien d'autres encore, sont transformées en combinaisons incolores par un grand nombre de bactéries et reprennent à l'air leur couleur première. Le lait convient particulièrement bien pour la démonstration de ces transformations, quand on y ajoute p. ex. du tournesol ou de l'indigo et qu'on le laisse s'aigrir ou se gâter dans des tubes à réaction profonds. La consommation d'oxygène peut être mesurée approximativement par l'épaisseur de la couche colorée qui se trouve au-dessus du lait caillé et décoloré, et qui indique jusqu'à quelle profondeur l'air y pénètre. De même le bleu de Prusse et le bleu de Turnbull, formés par précipitation dans du bouillon de viande, sont transformés en corps incolores par plusieurs espèces de bactéries, et redeviennent bleus à l'air. Les réactions que l'on rencontre à ce dernier propos sont surprenantes et méritent un examen plus approfondi.

En outre, la plupart des bactéries sont capables de former une substance colorante bleu intense aux dépens du ferricyanate ferrique brun. La réaction est bien appropriée pour des cultures sur plaques et s'opère comme suit. A de la gélatine au bouillon de viande on ajoute un peu de citrate d'ammonium, de pyrophosphate de fer citri-ammoniacal et du ferricyanate de potassium; de cette façon on obtient, après solidification, une plaque jaunâtre, presque absolument inoffensive pour les microbes. Quand on y verse de l'eau de canal on reconnaît en premier lieu les formes de *Coli* et les formes voisines à la couleur bleu intense de leurs colonies. Petit à petit on voit aussi se co-

lorer les colonies moins actives, de sorte que cette méthode aussi permet d'estimer d'une manière assez précise le degré d'intensité du pouvoir réducteur des diverses espèces. Mais nous ne savons pas encore bien à quel phénomène biochimique ce processus doit être attribué.

Chez les ferments alcooliques la fonction réductrice des substances colorantes est faible ou absente. Toutefois, par l'emploi d'une grande quantité de levure, le bleu de méthylène peut être décoloré. Ce pouvoir est lié ici au protoplasme d'une façon analogue à la fonction alcoolique, ainsi qu'il résulte du fait que chez la »Dauerhefe« de MM. Buchner et Rapp[1]), qui ne peut pas croître mais bien provoquer une fermentation, la fonction réductrice du bleu de méthylène existe encore.

Si l'on tient à attribuer à un enzyme la fonction réductrice de la cellule de levure, comme on le fait souvent aujourd'hui pour la fonction alcoolique, rien ne s'y oppose, pourvu que l'on observe que le mot enzyme perd alors sa signification primitive.

Le meilleur exemple du fait que certaines bactéries chromogènes sont capables de décolorer les substances colorantes qu'elles ont elles-mêmes formées (ce que l'on appelle la »réaction caméléon«) est fourni par *Bacillus pyocyaneus,* qui produit la pyocyanine. Le même phénomène s'observe d'ailleurs chez *B. viridis* et *B. indigoferus.*

La plupart des autres bactéries pigmentaires chromogènes, comme *B. cyanogenus* du lait bleu, *B. violaceus* qui est si abondant dans les eaux sales et *B. prodigiosus,* ne réduisent pas le pigment qu'elles préparent.

Chez les formes chromatophores, c. à d. chez ces espèces dont la substance colorante n'est pas cédée au milieu ambiant, mais reste liée au protoplasme, on n'observe évidemment jamais de réduction du pigment.

VI. La réduction des sulfates avec formation de H^2S, soufre, sulfites, thiosulfates et tétrathionates.

A. La réduction des sulfates en général.

Les deux phénomènes de réduction les plus importants, continuellement en train dans notre entourage dans ce qu'on appelle la »minéralisation« des substances organiques, sont la réduction des nitrates, dont il vient déjà d'être brièvement question, et celle des sulfates.

La réduction des sulfates peut être »indirecte«, — terme qui sera expliqué tout à l'heure, — ou »directe«.

Le dernier processus, particulièrement intéressant par son ubiquité et son intensité, est de la nature d'une vraie fermentation. Son étude rencontre de grandes difficultés, parce que les bactéries qui le produisent appartiennent aux »anaérobies«, sont très sensibles aux changements des circonstances extérieures, et ne peuvent être obtenues que très difficilement en cultures pures. Comme il est important de connaître avec précision les conditions vitales de ces organismes, j'ai entrepris sur cette question, avec le concours de M. A. van Delden, un examen soigneux et de longue durée.

---

[1]) On peut se la procurer chez M. Schröder, fabricant de levure, Landwehrstrasse, à Munich.

Mais avant de communiquer les résultats de ces recherches, il est nécessaire de faire quelques observations sur la »réduction indirecte« des sulfates. Il s'agit d'une fonction très faiblement développée, malgré des conditions nutritives très avantageuses, chez divers microbes aérobies ou anaérobies sporogènes. J'ai cru tout d'abord que l'hydrogène sulfuré, qui s'y formait, devait être mis tout entier sur le compte du soufre combiné dans les matières albuminoïdes contenues dans la nourriture; mais j'ai reconnu qu'il n'en est pas ainsi, et qu'il y a réellement des sulfates qui disparaissent, apparement parce qu'ils participent à la construction du protoplasme, riche en soufre, des corps de ces microbes, décomposés après leur mort avec dégagement d'acide sulfhydrique ou d'autres sulfures. On voit par là que dans ce cas le H^2S est en fait formé aux dépens des matières albuminoïdes, mais ces dernières ont dû être formées d'abord à l'aide des sulfates, de sorte que ce phénomène mérite bien le nom de »réduction indirecte« des sulfates.

Je recommande les deux expériences suivantes pour l'observation de cette forme de la réduction.

B. Putréfaction de la fibrine avec ou sans sulfates.

Quand on introduit dans deux petits ballons un peu de fibrine finement divisée, qu'on la mélange avec de l'eau pour en forme une pâte, qu'on y ajoute 0,02% K^2HPO^4 et 0,001 $MgCl^2$ et en outre à un des ballons 0,02% $MgSO^4$, qu'on infecte enfin par du terreau et qu'on cultive à 35 C., on observe ce qui suit.

Au bout de deux ou trois jours du papier au plomb, suspendu dans le col des ballons, se colore en noir dans le ballon à $MgSO^4$, mais est resté blanc dans le ballon sans sulfate. La »réduction du sulfate« est donc certaine, mais elle est si faible que la quantité qui a disparu ne dépasse pas $^1/_{20}$% $MgSO^4$. Les myriades de microbes ont absorbé le sulfate et leurs cadavres se décomposent avec production de sulfides. Quelques jours plus tard le ballon à fibrine sans sulfate commence aussi à dégager fortement H^2S, ce qui prouve qu'à ce moment le soufre de la fibrine elle-même est mis en liberté à l'état sulfure.

Comme ce phénomène s'observe aussi bien quand on infecte avec du terreau pasteurisé qu'avec du terreau frais, il est évident qu'il est produit par des bactéries sporogènes.

C. Formation indirecte de sulfides par Coli et Aërogenes.

J'ai fait voir antérieurement [1]) que, moyennant une nutrition et une aération actives, les bactéries de fermentation des groupes *Coli* et *Aërogenes*, universellement répandues, sont capables de produire, aux dépens des matières albuminoïdes, des sulfides qui transforment en sulfure le carbonate de plomb. L'expérience suivante prouve que ces bactéries peuvent former également une petite quantité de sulfide, par voie indirecte, aux dépens de sulfates. On met un peu de carbonate de plomb entre deux filtres, que l'on place dans une cuvette en verre; on prépare ainsi deux de ces cuvettes; dans l'une on verse un peu d'une solution nutritive de la composition suivante:

---

[1]) Formation de l'hydrogène sulfuré dans les canaux. Ces *Archives*, (2), 4, 1, 1901.

H^2O	100
Asparagine . . .	0,5
Saccharose . . .	5
K^2HPO^4	0,02
$MgCl^2$	0,01

et dans l'autre un peu de la même solution où l'on a remplacé $MgCl^2$ *par* $MgSO^4$.

A la surface des filtres on trace des traits inoculatoires avec *Coli* et *Aërogenes* et on cultive à 28° C. Au bout de un à deux jours on observe que sur les filtres avec $MgSO^4$ les traits de *Coli* sont devenus brun pâle, ceux de *Aërogenes* brun foncé, tandis que sur les filtres à $MgCl^2$, pour le même développement, les traits sont restés incolores. Comme les diverses variétés de *Coli* et *Aërogenes* se comportent différemment, l'expérience ne réussit pas toujours avec la même netteté.

L'explication du phénomène est la même que dans le cas précédent.

D. La réduction directe des sulfates par des spirilles.

Comme cause de la »réduction directe« des sulfates dans la boue de nos canaux et fossés, j'ai découvert en 1894 une petite espèce de spirille anaérobie, à laquelle je donnai le nom de *Spirillum desulfuricans*[1]. Comme cet organisme ne présente généralement qu'un tour de spire et est très petit, on doit le rattacher au genre *Microspira* que M. Migula a établi depuis. Des recherches ultérieures ont appris que la réduction des sulfates dans l'eau de mer est également produite par une *Microspira,* obtenue en culture pure pour la première fois par M. A. van Delden et qui reçut le nom de *Microspira aestuarii,* parce qu'elle habite à proprement parler les bas-fonds (en hollandais »walden«) et les alluvions (»schorren«) de notre côte[2].

Quiconque connaît nos côtes argileuses sait que le sol en est coloré en noir par du sulfure de fer, jusqu'à une profondeur assez grande, *inconnue* d'ailleurs; cette substance est le produit de l'activité de *M. aestuarii* et se forme par la réduction de $FeSO^4$ ou de $CaSO^4$ en présence d'un sel de fer. Les conditions vitales des formes d'eau douce et marines sont à peu près les mêmes; la différence principale est un pouvoir réducteur plus grand chez *M. aestuarii,* qui est capable de former 925 mgr. de H^2S par litre, correspondant à 2240 mgr. de SO^3, tandis que *M. desulfuricans,* à pouvoir beaucoup plus faible, ne peut former que 246 mgr. de H^2S tout au plus, ce qui revient à 580 mgr. de SO^3 par litre. Une seconde différence capitale consiste en ceci, que *M. desulfuricans* ne peut supporter que de 0 à environ 2% *NaCl* dans son milieu nourricier, tandis que *M. aestuarii* en supporte de 1½ à 6%. Ces nombres prouvent donc que dans une eau saumâtre, contenant de 1½ à 2% de sel marin, les deux formes peuvent exister côte à côte. Pour ce qui regarde la nourriture organique, les conditions vitales des deux espèces sont sensiblement les mêmes. De nombreuses expériences ont appris que la vie de nos spirilles peut être entretenue à l'abri de l'air par les substances alimentaires les plus diverses, y compris la cellulose en décom-

---

[1]) Le *Spirillum desulfuricans*, agent de la réduction des sulfates. Ces *Archives* 29, 233, 1896.

[2]) A. van Delden, Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduction durch *Microspira. Centralbl. f. Bacteriol.* 2te Abt. Bd. 11, pg. 81, 1903.

position; voilà pourquoi dans la nature on peut observer une formation de sulfures partout où des matières organiques se trouvent à côté de sulfates, c. à d. presque partout. Nous avons reconnu que les lactates et les malates sont des sources de carbone particulièrement avantageuses, et que comme sources d'azote surtout l'asparagine et la peptone se laissent facilement assimiler. Comme solutions nutritives complètes je recommande surtout les liquides suivants. Pour *M. desulfuricans:*

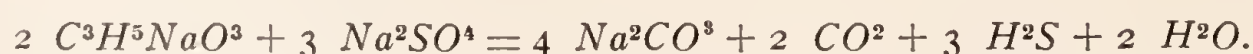
Eau de conduite ou de canal . .	100
Lactate de sodium	0,5
Asparagine	0,1
K^2HPO^4	0,05
$MgSO^4 . 7\ H^2O$	0,1
Sel de Mohr	0,01—0,02

et pour *M. aestuarii:*

Eau de conduite	100
$NaCl$	3
K^2HPO^4	0,05
Lactate de sodium	0,5
Asparagine	0,1
$MgSO^4 . 7\ H^2O$	0,25—0,4
Sel de Mohr	0,02—0,01.

Par suite du phosphate de potassium ces mélanges ont une réaction légèrement alcaline; ils sont troubles par un précipité de phosphate de fer et de chaux. On doit faire les expériences dans des flacons pas trop petits, à bouchon de verre fermant hermétiquement, et complètement remplis pour éviter autant que possible le contact de l'air.

Le processus de réduction qui s'y opère a lieu de la manière suivante, ainsi que les déterminations quantitatives de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène sulfuré nous en ont donné la certitude:



$$2\ C^3H^5NaO^3 + 3\ Na^2SO^4 = 4\ Na^2CO^3 + 2\ CO^2 + 3\ H^2S + 2\ H^2O.$$

Ce processus est exothermique et donne lieu à un dégagement de 42,7 cal., soit 0,1 cal. par gr. de Na^2SO^4 réduit.

On commence l'expérience avec un peu de vase de canal ou de mer. Pour être certain de la réussite de l'expérience on peut ajouter au flacon un peu de sulfite de sodium, mais ce n'est pas indispensable. Quand la formation de H^2S a duré assez longtemps, dix jours par exemple, pour que plus de la moitié de la quantité de sulfate disponible soit décomposée, on transporte une gouttelette de la culture dans un flacon contenant la même nourriture, mais stérilisée et où l'on n'a pas introduit de sulfite. On répète les transports et bientôt on obtient un processus d'allure très constante. L'examen bactériologique a du reste fourni à ce propos un résultat très remarquable. Par transport sur une plaque de gélatine à bouillon de viande, où *Microspira desulfuricans* ne peut se développer puisqu'il est anaérobie, les réductions grossières par cette dernière espèce fournissent toujours une culture pure d'une variété déterminée de

Coli[1]), tandis que les cultures grossières de *M. aestuarii*, transportées sur une gélatine à bouillon de viande avec 3% *NaCl*, où *M. aestuarii* ne peut pas non plus se développer comme anaérobie, donnent exclusivement un *Micrococcus* particulier.

Ni cette forme de *Coli*, ni le *Micrococcus* ne peuvent réduire les sulfates directement, mais ce sont les seuls microbes qui, dans la lutte pour l'existence, peuvent l'emporter sur les autres organismes aérobies, qu'ils refoulent donc, et ce sont eux qui enlèvent l'oxygène des solutions nutritives d'une façon si complète que les microspirilles de la réduction de sulfates peuvent s'y développer vigoureusement.

Pour obtenir ces derniers organismes en culture pure, on peut se servir des liquides mentionnés, mélanges avec 10% gélatine, mais on doit y ajouter en outre un corps avide d'oxygène. A cet effet on peut employer avec avantage une quantité de H^2S plus que suffisante pour enlever presque tout l'oxygène dissous (voyez pag. 194); mais, comme dans ces circonstances il n'est pas permis de faire usage d'un sel de fer comme indicateur, pour reconnaître les colonies productrices de H^2S, l'emploi de Na^2SO^3 par M. van Delden constitua un grand progrès.

Mais même dans ces conditions la culture pure de nos spirilles est difficile, parce que ce ne sont jamais des germes isolés qui se développent, mais des agrégats de ces germes, et l'on conçoit que ces agrégats contiennent presque toujours quelques individus de *Coli* ou du *Micrococcus*.

Il s'ensuit que, quand on inocule les cultures grossières pour la première fois dans la gélatine, les colonies qui, par la formation de sulfure de fer, prouvent qu'elles contiennent des spirilles actifs, ne sont jamais pures mais contiennent aussi le *Coli* ou le microcoque. Pourtant, si l'on effectue un nouveau transport de ces colonies sur la gélatine de culture, au fond d'une éprouvette profonde, il y a de grandes chances de voir se développer ici ou là un agrégat de spirilles tout à fait pur, ce que l'on reconnaît d'ailleurs à la coloration noire intense, produite dans ce cas par la colonie. Nous sommes réellement parvenus de cette manière à purifier *M. desulfuricans* aussi bien que *M. aestuarii*, et à les conserver à l'état pur par des transports réguliers à l'intérieur de la gélatine nourricière.

Les expériences de réduction faites avec ces cultures pures sont surtout intéressantes parce qu'elles commencent bientôt et sont beaucoup moins dépendantes de la nourriture que les cultures grossières; cela provient évidemment de l'absence d'espèces microbiennes ennemies, comme les bactéries putréfiantes et les ferments butyriques, qui refoulent si aisément ces spirilles des cultures grossières, p. ex. dans l'eau de viande et dans les solutions sucrées. Dans des flacons remplis de bouillon de viande, avec une trace de sel de Mohr comme indicateur, les cultures montrent à 30° C. la réduction des sulfates déjà au bout de 24 heures. Ce n'est donc pas tant la grande sensibilité des spirilles réducteur pour de hautes concentrations des substances organiques que l'influence des microbes antagonistes, mieux adaptés que les spirilles à ces hautes concentrations, qui explique pourquoi la réduction des sulfates dans des expériences de laboratoire est restée si longtemps obscure.

Enfin, j'ajouterai encore que *M. desulfuricans*, aussi bien que *M. aestuarii*, transforment les sulfites et les thiosulfates ($Na^2S^2O^3$) en H^2S encore plus facilement que

---

[1]) C'est là ce qui a fait croire à M. Saltet (Handel. 7e Congres, Haarlem 1899, pg. 378) que c'est *Coli* qui provoque la réduction des sulfates.

les sulfates, et que la présence de nitrates et de nitrites empêche complètement tous ces processus.

La grande quantité de H^2S, continuellement produite dans la nature par les microbes réducteurs des sulfates, entretient comme on sait une flore et une faune microbiennes très riches et très remarquables. Cette substance est en outre le point de départ de bien d'autres phénomènes de réduction encore, soit qu'elle agisse directement et décolore p. ex. des substances colorantes, comme le bleu de méthylène, soit qu'elle commence par être plus ou moins complètement oxydée. Dans ce dernier cas elle donne naissance à du soufre libre, aux thiosulfates ($S^2O^3Na^2$), aux sulfites (SO^3Na^2), aux tétrathionates ($S^4O^6Na^2$), ou enfin elle régénère les sulfates eux-mêmes. Tous ces corps donnent lieu à des processus très intéressants, que nous avons appris à connaître seulement dans les derniers temps.

Ces corps peuvent du reste se comporter de deux façons différentes. En premier lieu, ils peuvent retourner à l'état d'acide sulfhydrique. En second lieu, leur oxydation peut fournir l'énergie nécessaire aux microbes intéressés pour se servir exclusivement d'acide carbonique comme source de carbone, c. à d. pour réduire cet acide carbonique et le transformer donc en des combinaisons plus riches en carbone.

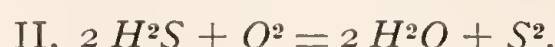
Ces deux biochimismes seront traités successivement; commençons par la biogenèse des sulfures. Tandis que la propriété de réduire les sulfates appartient au groupe bien déterminé de *Microspira*, il n'en est pas de la formation de H^2S aux dépens des combinaisons inférieures du soufre et de l'oxygène, ou aux dépens du soufre même, qui sont aisément transformés en sulfures par un grand nombre d'espèces de microbes. Voici quelques cas principaux.

VII. Formation de sulfures aux dépens d'oxydes inférieurs du soufre et du soufre lui-même.

A. La réduction des sulfites par la bactérie des sulfites.

En isolent les spirilles réducteurs des sulfates nous avions remarqué de temps en temps que notre gélatine de culture contenait quelques colonies, où s'amassaient de grandes quantités de soufre libre. Dans certains cas nous avions constaté le même phénomène dans des expériences, à l'aide des chambres de verre, pour observer des mouvements ou des lignes de respiration. Enfin nous avons reconnu que dans ce phénomène agit une espèce de bactérie particulière, qui possède les deux propiétés remarquables suivantes. Moyennant une nutrition carbonée convenable, elle réduit les sulfites à l'état d'hydrogène sulfuré, et, si l'on permet une aération modérée, elle oxyde le H^2S avec dépôt de soufre. Ces réactions peuvent donc être représentées par les deux formules suivantes:


$$\text{I. } C^3H^5NaO^3 + 2\,Na^2SO^3 = CO^3NaH + 2\,CO^3Na^2 + 2\,H^2S.$$


$$\text{II. } 2\,H^2S + O^2 = 2\,H^2O + S^2.$$

Cette bactérie est »anaérobie« (fortement microaérophile); elle ne se laisse pas cultiver à l'air libre et dans des tubes profonds elle donne, dans la gélatine à lactate et asparagine, à quelque distance de la surface un niveau de soufre très remarquable. On constate que ce soufre n'est déposé à l'état de gouttelettes que dans l'intérieur des colonies, qui sont constitutées par de petits bâtonnets courts et mobiles.

Il n'y a que quelques bactéries dont le corps même contient des gouttes de soufre. Elles ne produisent pas de spores et ne liquéfient pas la gélatine.

B. Autres microbes qui peuvent transformer les sulfites en sulfides.

La propriété de réduire les sulfites n'appartient pas exclusivement à la bactérie des sulfites; il semble que tous les microbes qui forment aisément H^2S aux dépens du soufre et des thiosulfates la possèdent. Il est du moins certain qu'il en est ainsi pour les levures actives, c. à d. celles de la bière, du vin et du pain *(Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoideus, S. panis),* et pour les bactéries du groupe *Coli.*

Vu la facilité avec laquelle les sulfites absorbent l'oxygène de l'air pour s'oxyder à l'état de sulfates, les expériences ne peuvent pas se faire sur plaques mais doivent être faites à l'abri de l'air, donc dans des liquides ou au fond de tubes à réaction profonds.

Avec la levure on réussit le plus facilement en ajoutant 0,1% Na^2SO^3 à une solution à 10% de sucre de canne, que l'on fait vivement fermenter. Le papier au plomb permet de constater le dégagement de H^2S.

On peut examiner le groupe *Coli* au moyen d'un mélange dont la composition est

Eau	100
Glucose . . .	5
Asparagine .	0,1
K^2HPO^4 . . .	0,01
SO^3Na^2 . . .	0,05.

Au bout de 24 heures de culture à 28° C. le papier au plomb, suspendu au-dessus du liquide dans le col du ballon, se colore en noir.

Le même mélange à gélatine et 0,01% de sel de Mohr comme indicateur, introduit dans des tubes profonds, se colore en noir au bout de quelques jours, quand on y sème le *Coli* à la surface ou quand y introduit le même microbe à l'intérieur.

C. Formation de sulfides aux dépens de thiosulfates ou du soufre.

Quand on remplace dans les dernières expériences le sulfite *(Na^2SO^3)* par du thiosulfate *($Na^2S^2O^3$)*, on constate que le dégagement de H^2S est encore plus vif. Le processus change d'ailleurs en même temps de nature car, bien que l'on n'observe aucune séparation de soufre, on doit néanmoins admettre que du soufre se sépare réellement pour être immédiatement transformé en H^2S. Le sulfite produit restant peut alors subir à son tour la désoxydation dont il a été question à propos de cette substance même. Les raisons pour lesquelles on se figure le phénomène de la sorte sont les suivantes. *En premier lieu,* par la séparation de soufre du thiosulfate il se dégage de la chaleur, ce qui fait que cette scission peut être utile comme source d'énergie et peut aisément avoir lieu. *En second lieu,* en présence de la nourriture organique nécessaire, plusieurs bactéries transforment S en H^2S (ou un autre sulfure), de sorte qu'il n'est pas nécessaire que le soufre, séparé du thiosulfate, devienne visible comme tel.

Ces faits donnent lieu à diverses expériences, dont je citerai les suivantes.

Expérience aux vibrions. A de la gélatine au bouillon de viande ordinaire on

ajoute ½% $Na^2S^2O^3$ ou 2% de fleur de soufre et un peu de pyrophosphate de fer citri-ammoniacal des pharmaciens comme indicateur; après la coulée et la solidification de la plaque on y verse de l'eau de canal, dont on enlève ensuite l'excès et on cultive à 23° C. Au bout de quelques jours on voit s'y développer le mélange ordinaire de bactéries, où les colonies de vibrions deviennent brun-noir par la formation de *FeS*, tandis que celles des bactéries qui produisent moins énergiquement H^2S, comme *Coli*, se présentant avec une teinte brun-clair. Contre toute attente, on observe que cet *FeS* ne s'oxyde que très lentement à l'air, et c'est là ce qui donne à l'expérience son élégance. Cette oxydation se produisant toutefois, les colonies dont le pouvoir de former H^2S est faible restent incolores.

Pour plus de simplicité, nous ne parlons ici que de H^2S, mais il se peut fort bien qu'il se produise encore d'autres sulfides; cela ne fait toutefois aucune différence en principe.

Cette expérience peut servir à prouver que sur des restes d'animaux en putréfaction les vibrions sont beaucoup plus nombreux que dans le sol ou dans l'eau de canal brute, et qu'il est possible d'accumuler ces organismes en introduisant la matière à examiner dans des solutions de peptone ou dans un bouillon de viande.

Dans mon laboratoire on prouve ainsi, avec grande certitude, l'existence dans notre eau de canal d'une espèce de vibrion, différente de *Vibrio proteus*, et à laquelle nous donnons le nom de *Vibrio devorans*, en égard, à la façon, caractéristique dont elle ronge les plaques de gélatine.

Expériences avec des levures et avec des bactéries du groupe Coli. Les expériences précédemment décrites, relatives à la formation de H^2S, aux dépens de sulfites, par des levures alcooliques et par le groupe *Coli*, peuvent être rendues beaucoup plus convaincantes encore en remplaçant le sulfite par de la fleur de soufre ou par un thiosulfate. Surtout la présence des deux substances nommées en dernier lieu dans des fermentations alcooliques intenses donne lieu à une formation énergique de sulfide ou de H^2S.

En vertu de ce qui précède, il est donc tout naturel que la vase des canaux, mélangée de fleur de soufre, dégage un torrent de H^2S, surtout quand on y ajoute en outre 0,01% K^2HPO^4 et une source de carbone, p. ex. de la cellulose (l'azote y est déjà présent en quantité suffisante).

VII. La question de l'existence d'enzymes réducteurs spécifiques, l'»Hydrogénase« et la »Réductase«.

Quand on fait un extrait de levure de boulanger ou de levure de bière au moyen d'alccol à 50%, la cellule meurt; si l'on introduit maintenant un peu de fleur de soufre dans l'extrait filtré, clair et sans cellules, on constate qu'il s'en dégage un peu de H^2S. En abandonnant l'extrait à lui-même ou en le chauffant on observe qu'il perd rapidement cette propriété. Il paraît donc que dans ce cas aussi la parti du protoplasme vivant, d'où provient l'hydrogénation, est quelque peu soluble, et il est recommandable de lui donner le nom d'»hydrogénase«[1]).

---

[1]) L'ingénieur M. Rey Pailhade, qui a découvert cet enzyme, l'a appelé »philothion«. Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre à froid, *Comptes rendus*, 106, 1683, 1888.

Il n'est pas impossible que l'on parvienne un jour à prouver l'existence d'une hydrogénase dans les bactéries considérées dans ce travail. Il ne peut toutefois pas être question ici d'un enzyme soluble, tel que la diastase ou la trypsine, — dans tous les cas la substance est insoluble pour de beaucoup la plus grande partie. Il paraît que c'est un élément constitutif du protoplasme dont elle ne se laisse pas séparer. Aussi, dans l'étude ultérieure de la fonction réductrice devra-t-on nécessairement prendre comme point de départ la cellule vivante elle-même. De cette manière seulement la fonction sera connue dans toute son étendue, mais non par une préparation de quelques parties mourants ou mortes du protoplasme, enlevées à la cellule par de rudes procédés chimiques, où la fonction dont il s'agit ne peut être que difficilement démontrée et dont l'étude ne peut conduire qu'à des conceptions défectueuses du mécanisme de la vie. Ce n'est que dans le cas où il est possible d'extraire de la cellule une substance active, de telle façon que le processus qui se produit sous l'action de cette substance soit plus intense et plus parfait que sous l'action des cellules ellemêmes, que l'isolement en a quelque importance. Cependant, pour ce qui regarde les enzymes ordinaires solubles, même dans ce cas l'utilité de leur isolement n'est pas bien grande, car les préparations obtenues sont généralement si impures que quelques impuretés de plus ou de moins sont presque sans influence.

Il n'a pas été possible de déceler l'»hydrogénase« dans des levures ou des bactéries tuées au chloroforme ou à l'alcool. Cet enzyme »meurt« donc avec le protoplasme; mais la possibilité de conserver l'activité d'une petite portion par un extrait alcoolique fait avec précaution prouve que la vie s'y maintient avec plus de ténacité que dans le »protoplasme moyen.«

Tout ce qui vient d'être dit ici de l'hydrogénase s'applique d'une manière correspondante à cette partie du protoplasme qui possède la propriété d'enlever de l'oxygène, et que l'on pourrait donc qualifier de »réductase«. Mais à propos de cette dernière substance on n'est pas encore parvenu à démontrer son action en dehors de la cellule vivante; aussi certains auteurs considèrent-ils cette forme de la fonction réductrice comme un critérium spécifique de la vie et rejettent-ils toute idée d'enzyme.

VIII. Réduction de l'anhydride carbonique par des bactéries incolores, avec le soufre, l'hydrogène sulfuré, un thiosulfate ou un tétrathionate comme source d'énergie.

M. Winogradsky a prétendu que les ferments de la nitrification emploient l'énergie, mise en liberté par l'oxydation des sels ammoniacaux en nitrites et des nitrites en nitrates, pour la réduction de l'anhydride carbonique afin de se procurer le carbone nécessaire à la nutrition. Je n'ai pas pu me convaincre de l'exactitude de cette assertion, mais j'ai fait voir dernièrement[1]) que M. Winogradsky n'a pas remarqué l'existence, dans les liquides nitrifiants, d'un microbe *(Bacillus oligocarbophilus)* qui se nourrit du carbone organique contenu dans l'air du laboratoire.

C'est à ce microbe, dont la respiration fournit donc de l'énergie de la manière ordinaire, et non aux ferments de la nitrification, que l'on doit attribuer l'accumulation

---

[1]) *Centralbl. f. Bacteriologie*, 2te Abth. Bd. 10, pag. 33, 1903.

de carbone que l'on observe parfois dans les liquides nitrifiants de laboratoire. Aussi, dans une serre, où l'air est beaucoup plus pur, on n'observe qu'une très faible fixation de carbone atmosphérique, bien que la nitrification soit tout aussi énergique, à condition toutefois que les appareils de culture ne contiennent pas d'organismes verts.

Dernièrement M. Natanssohn[1]) a repris la question. Il a montré que l'oxydation de H^2S et de $Na^2S^2O^3$ dans l'eau de mer permet à certaines bactéries marines de réduire CO^2 et de s'en nourrir.

L'exactitude de cette observation, je puis l'affirmer et l'étendre par mes propres expériences.

J'ai reconnu tout d'abord que le phénomène se produit plus facilement encore dans l'eau douce que dans l'eau de mer et que les bactéries spécifiques de ce processus sont très répandues dans l'eau et dans la vase des canaux.

Les épreuves sont excessivement simples et élégantes.

A. Réduction de l'anhydride carbonique avec un thiosulfate, un tétrathionate ou H^2S comme source d'énergie.

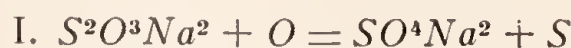
Dans un ballon ordinaire avec libre accès de l'air on introduit la solution suivante:

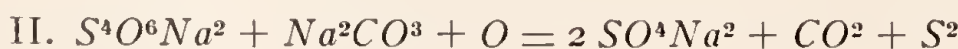
H^2O	100
$Na^2S^2O^3 . 5H^2O$	0,5
K^2HPO^4	0,02
$(NH^4)Cl$	0,01
$NaHCO^3$	0,1
$MgCl^2$	0,01 ;

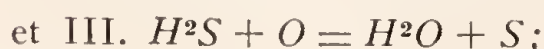
on infecte avec une grande quantité d'eau ou de vase de canal et on cultive entre 25 et 30° C. Au bout de deux ou trois jours la surface se recouvre d'une fine couche de soufre, contenant une des bactéries dont il s'agit sous forme de bâtonnets courts et mobiles.

Par transport de la pellicule dans le même mélange mais sans vase, on obtient déjà au bout de 24 heures une magnifique culture, très riche en bactéries.

Dans le liquide de culture $Na^2S^2O^3$ peut être remplacé par $Na^2S^4O^6$ ou CaS, et le 0,1% de bicarbonate de sodium par 0,05% Na^2CO^3. Les réactions qui se produisent alors sont:


I. $S^2O^3Na^2 + O = SO^4Na^2 + S$


II. $S^4O^6Na^2 + Na^2CO^3 + O = 2\,SO^4Na^2 + CO^2 + S^2$


et III. $H^2S + O = H^2O + S;$

ces processus sont tous exothermiques et l'énergie qu'ils mettent en libérté produit la réduction de l'anhydride carbonique.

Quand on prend toutes les précautions nécessaires pour éliminer les dernières traces de substances organiques, l'expérience réussit tout aussi bien. Au contraire, l'addition de matières organiques les plus différentes aux liquides de culture entrave

[1]) Ueber eine neue Gruppe von Schwefelbacterien. *Mitt. a. d. Zool. Station Neapel*, Bd. 15, H. 4, p. 655, 1903.

le développement de ce microbe remarquable. Aussi l'acide carbonique ne peut-il être remplacé ni par l'urée, ni par des oxalates ou des formiates.

Quand on traite la pellicule au benzène pour dissoudre le soufre, le benzène est rendu trouble par des gouttelettes d'eau où se rassemblent les bactéries. Ces dernières sont précipitées par l'alcool, qui dissout le benzène, et l'on constate alors que le nombre des bactéries est si considérable que l'on ne saurait douter de la réduction de l'anhydride carbonique pour la production de la substance organique accumulée dans la matière bactérienne.

Pour obtenir la bactérie en culture pure, on étend les cultures liquides sur une plaque obtenue en mélangeant la solution décrite à de l'agar. Les colonies de bactéries productrices de soufre sont reconnaissables, au bout de deux ou trois jours, à la grande quantité de soufre qui s'y sépare et qui leur donne un aspect poussiéreux, ce qui n'a pas lieu chez les espèces concomitantes. Parmi ces dernières le *Vibrio devorans* déjà mentionné à la pag. 204 est remarquable, parce qu'on constate que la présence de soufre favorise son accumulation et que cette espèce, qui ne peut décomposer CO^2, se nourrit des cadavres des bactéries du soufre. Je propose de donner à cette dernière espèce le nom de *Thiobacillus thioparus*. C'est une bactérie en forme de bâtonnets courts, très sensible aux conditions extérieures, ne formant pas de spores, apparentée aux *Microspira*, et dont la figure de respiration est du type des spirilles.

B. Dénitrification avec S comme source d'énergie pour la réduction de CO^2.

L'expérience suivante, où l'oxydation du soufre aux dépens de KNO^3, c. à d. un processus de dénitrification inorganique, est la source d'énergie, n'est pas moins convaincante que les précédentes pour la réduction de CO^2 avec production de matière organique.

Un flacon bien bouché *et privé d'air* est rempli de:

Eau de canal . . .	100
Soufre[1])	10
KNO^3	0,05
Na^2CO^3	0,02
$CaCO^3$	2
K^2HPO^4	0,02;

la culture se fait vers 28° C. L'eau et la vase de canal contiennent la bactérie qui, dans ces conditions, peut se nourrir de CO^2 comme source de carbone, c. à d. peut réduire CO^2 à l'état des combinaisons plus riches en carbone dont le corps des bactéries est constitué.

L'eau de canal contient d'ailleurs un peu de substance organique, favorable à la mise en train du processus dénitrificateur.

Au bout de quelques jours, on reconnaît au fort dégagement d'azote libre et d'anhydride carbonique que le processus a commencé, et l'on peut maintenant transporter dans un flacon fermé, rempli de:

---

[1]) Finement pulvérisé.

H^2O	100
Soufre	10
KNO^3	0,05
K^2HPO^4 . . .	0,02
$CaCO^3$	2
Na^2CO^3 . . .	0,01
$MgCl^2$	0,01,

où la transformation se poursuit modérément à 28° C., principalement suivant la formule



$$6\,KNO^3 + 5\,S + 2\,CaCO^3 = 3\,K^2SO^4 + 2\,CaSO^4 + 2\,CO^2 + 3\,N^2;$$

ce processus est de nouveau exothermique et donne lieu au dégagement de 659,5 cal., soit 1 cal. par gr. de KNO^3 employé.

Dans un flacon hermétiquement clos, d'une capacité de 210 cm³., 900 mgr. de KNO^3 disparaissaient en une douzaine de jours, en présence d'un excès de soufre et de craie. On introduisait le salpètre tous les deux ou trois jours par quantités de 100 à 200 mgr., quand on constatait que la quantité précédemment ajoutée avait disparu.

La quantité de soufre, correspondant au salpètre ainsi transformé, aurait dû être de 0,4325 gr., pesée à état de $BaSO^4$. En réalite on ne trouvait que 0,283 gr. de $BaSO^4$. Il s'ensuit que la moitié à peu près du salpètre avait disparu d'autre manière, problement par une dénitrification aux dépens de substances organiques faisant partie des bactéries elles-mêmes, vivantes ou mortes.

Le liquide superposé au soufre et à la craie qui se déposent dans les flacons, primitivement limpide comme de l'eau pure, se trouble peu à peu par suite du développement considérable des bactéries. Ce ne sont d'ailleurs pas seulement les bactéries actives dans le processus, et que j'appellerai *Thiobacillus denitrificans,* qui s'accumulent, mais on y reconnaît aussi en grand nombre le *Thiobacillus thioparus* dont je viens de parler, ainsi que quelques véritables saprophytes et parmi elles un petit spirille, un *Vibrio,* et le plus souvent aussi plusieurs individus de la bactérie dénitrifiante bien connue *Bacillus stutzeri* on d'une forme voisine.

La présence de *Th. thioparus* prouve qu'à côté du sulfate il doit se former encore d'autres combinaisons sulfureuses dans le liquide. Il est aisé de démontrer que l'hydrogène sulfuré, dont on constate très tôt la présence, dès qu'il n'y a plus de salpètre, en fait partie. Il est probable que la substance organique des corps des bactéries, qui peut donner lieu à une importante dénitrification, comme je viens de le dire, est en même temps le point de départ pour cette formation d'acide sulfhydrique.

La facilité avec laquelle se produit ce dernier phénomène, alors qu'au commencement il n'y avait en présence aucune autre source de carbone que l'anhydride carbonique, en fait à coup sûr un processus naturel des plus importants, constituant un grand facteur dans la formation de H^2S, présent en si grande quantité dans la vase marine, là où la profondeur de l'eau n'est pas bien grande.

Il est plus difficile d'obtenir une culture pure de la bactérie du soufre dénitrifiante qu'une pareille culture de l'espèce oxydante ordinaire, parce qu'il ne se développe que fort peu de germes sur les terrains de culture solides. Comme notre bactérie possède aussi la propriété d'oxyder un thiosulfate à l'air avec séparation de soufre, bien

qu'à un degré beaucoup plus faible que la dernière espèce, on peut se servir, pour la composition du terrain de culture, de la même recette qui a été donnée à propos de *Th. thioparus,* savoir:

Eau	100
$Na^2S^2O^3$	0,5
K^2HPO^4	0,01
$NaHCO^3$	0,02
Agar	2.

Sur ce terrain de culture les deux bactéries du soufre sont faciles à distinguer. Alors que *Th. thioparus* forme de petites colonies, complètement enterrées sous le soufre et faisant par là l'effet d'une poussière jaune, *Th. denitrificans* est caractérisé par de grandes colonies très minces, étalées, presque limpides, où le soufre mis en liberté ne s'observe qu'en petite quantité et produit un trouble peu apparent, formé de petites gouttelettes.

Par des transports répétés sur le même terrain, *Th. denitrificans* ne se conservait que pendant quelques opérations; il finissait par disparaître à cause d'une force végétative trop faible. Mais il est si facile d'isoler cette espèce des cultures accumulatrices, qu'il semble superflu de conserver les cultures pures.

Par inoculation sur une plaque de gélatine à l'eau de viande, étendue d'un volume égal de gélatine à l'eau pure et mélangée de 0,25% $Na^2 S^2 O^3$, *Th. denitrificans* forme des colonies, petites il est vrai, mais mettant beaucoup de *S* en liberté; cela est d'autant plus remarquable que sur ce terrain *Th. thioparus* ne croît pas du tout.

Pour terminer cet aperçu je ferai encore remarquer que dans quelques cas j'ai réussi à faire des expériences de dénitrification en flacons fermés, où l'énergie était fournie par $Na^2 S^2 O^3$ ou $H^2 S$ et où $Na^2 CO^3$ faisait l'office de source de carbone; je ne parvins cependant pas à donner par transports successifs une allure régulière à ce processus, ni à déterminer avec certitude les microbes actifs (appartenant probablement aux spirilles).

Conclusion:

Résumant tout ce qui précède, nous arrivons à l'aperçu suivant.

Les réductions produites par des microbes peuvent être basées sur une désoxydation ou sur une hydrogénation. Pour les substances actives dans ces phénomènes, c. à d. pour ces parties constitutives du protoplasme (endoenzymes) qui sont le siège de ces actions, je recommande les noms »réductase« et »hydrogénase«. Ce ne sont toutefois pas des enzymes ordinaires, puisqu'ils deviennent inactifs sous l'action des anesthétiques.

Au lieu des sélénites et tellurites vénéneux, il vaut mieux ajouter 0,1% de tellurate de potassium ($Ke^2 Te O^4$), un poison assez faible, à de la gélatine ou de l'agar au bouillon, pour obtenir un terrain où les bactéries aérobies se développent bien; en même temps la différente intensité avec laquelle le tellure noir est séparé constitue une bonne mesure du pouvoir réducteur. Le groupe *Coli* et les vibrions sont sous ce rapport apparemment les plus actifs. Les levures et les moisissures ne réduisent pas les tellurates.

Différentes espèces de levures et *Oidium lactis* réduisent l'acide molybdique libre à l'état de sel bleu.

Les sels ferriques organisques sont encore mieux appropriés que les sels ferreux pour démontrer la formation de sulfures ou de sulfides sous l'action des microbes aérobies. Le FeS ainsi formé est très stable à l'air, surtout dans de la gélatine au bouillon.

La réduction des sulfates en H^2S, opérée par les microbes anaérobies: *Microspira desulfuricans* dans l'eau douce et *M. aestuarii* dans l'eau de mer, donne lieu à une flore et à une faune microbiennes très riches en espèces, adaptées à H^2S; de plus, après la réduction de H^2S à l'état de soufre élementaire, de sulfite (Na^2SO^3), de thiosulfate $(Na^2S^2O^3)$ ou de tétrathionate $(Na^2S^4O^6)$, elle permet de nouveaux processus reducteurs dont ces substances sont le point de départ.

Le soufre, les sulfites et les thiosulfates sont transformés très facilement en H^2S par *M. desulfuricans* et *M. aestuarii,* de même que par plusieurs autres microbes, tant anaérobies qu'aérobies, surtout par des bactéries du groupe *Coli* et des vibrions.

Ces recherches conduisirent à la découverte d'une bactérie anaérobie non sporogène, produisant H^2S aux dépens de sulfites et oxydant cet H^2S à l'état de soufre par une faible aération. Cette espèce appartient probablement au genre *Thiobacillus,* mais elle a besoin d'une source organique de carbone pour se nourrir.

L'eau et la vase de canal contiennent en abondance deux espèces de bactéries, capables d'enlever leur nourriture carbonique à l'anhydride carbonique dans l'obscurité; elles doivent donc réduire CO^2. Chez l'une d'entr'elles, *Thiobacillus thioparus,* l'energie nécessaire à cette réduction est fournie par l'oxydation de H^2S ou de $Na^2S^2O^3$ ou $Na^2S^4O^6$ à l'état de Na^2SO^4 et S; chez l'autre, *Th. denitrificans,* l'énergie est empruntée à l'oxydation de S par la réduction d'un nitrate en N libre, à l'abri de l'air (dénitrification), suivant la formule:



$$6\,KNO^3 + 5\,S + 2\,CaCO^3 = 3\,K^2SO^4 + 2\,CaSO^4 + 2\,CO^2 + 3\,N^2.$$

Dans ce processus, qui est exothermique, le nitrite n'est pas reconnaissable, ou ne l'est que passagèrement. Dès que le KNO^3 est consommé, il se forme H^2S qui peut lui-même donner lieu à une dénitrification. Dans la boue de nos canaux il se forme donc toujours des substances organiques (corps bactériens), même dans l'obscurité, en présence de soufre ou d'hydrogène sulfuré. La même remarque s'applique à la vase marine.

L'énergie nécessaire à la réduction des sulfates est empruntée, tout comme dans la dénitrification ordinaire, à la nourriture organique, p. ex. à un lactate suivant la formule:



$$2NaC^3H^5O^3 + 3\,Na^2SO^4 = 3\,H^2S + 4\,Na^2CO^3 + 2\,CO^2 + 2\,H^2O;$$

cette transformation développe 42,7 cal., soit 0,1 cal. par gr. de Na^2SO^4.

L'oxygène enlevé au sulfate ou au nitrate donne donc lieu à un phenomène de combustion interne et peut par conséquent être appelé »oxygène d'oxydation«. Cet oxygène ne peut toutefois pas entretenir la vie à la longue: cela exige continuellement de nouvelles quantités d'oxygène libre, que l'on peut appeler de l'»oxygène d'excitation«.

Les aérobies ont besoin de grandes quantités de cet »oxygène d'excitation« tandis que les anaérobies se contentent de peu. Il n'existe pas d'anaérobies dans le sens strict du mot, il vaut donc mieux parler de »microaérophiles«. Mais pratiquement il est recommandable de continuer à se servir du terme »anaérobies« pour toutes les espèces qui ne se développent pas à l'air sous la pression ordinaire, et ne peuvent par là pas être obtenues en cultures sur plaques aérées.

Dans les milieux de culture ordinaires, soi-disant rendus exempts d'oxygène par des moyens chimiques, où l'on va cultiver des anaérobies, »l'épreuve des bactéries phosporescentes« permet de déceler aisément de l'oxygène libre. Cela s'applique aussi à l'eau sulfhydrique et à des solutions saturées de sulfites. Mais les solutions de H^2S formées, en flacons hermétiquement clos, par les microbes de la réduction des sulfates ne contiennent plus d'oxygène, comme on peut s'en assurer aussi à l'aide de notre épreuve. Il en est de même pour les fermentations alcooliques énergiques. Les microbes eux-mêmes possèdent donc le pouvoir d'éliminer complètement l'oxygène de leur entourage, alors que les agents chimiques en sont incapables.

Sur les bactéries actives dans le rouissage du lin.

Par M. W. BEIJERINCK et A. VAN DELDEN.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome IX, 1904, p. 418—441. — Verscheen onder den titel »Over de bacteriën, welke bij het roten van vlas werkzaam zijn« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Deel XII, 1904, blz. 673 - 693; en onder den titel »On the bacteria which are active in flax-rotting« in Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. VI, 1904, p. 462—481.

1. *Jusqu'où doit aller le rouissage.*

Le but du rouissage est de dissoudre partiellement et de ramollir l'écorce de la tige du lin, par l'enlèvement de la *pectose;* il en résulte la mise en liberté des faisceaux corticaux que l'on peut ensuite, après séchage, séparer aisément du bois par le broyage et le taillage. La *pectose* (*pt* fig. 1) [1]) est la substance qui constitue les parois des jeunes cellules ainsi que les couches extérieures des parois des vieilles. Pour autant que ces parois sont formées de *cellulose* dans sa forme résistante, un bon rouissage ne les transforme pas [2]).

Par le rouissage peuvent aussi se dissoudre les lamelles intermédiaires qui agglutinent les fibres des faisceaux, et alors les faisceaux se désagrègent en fibres élémentaires. Il n'est pas désirable que le processus aille jusque là, parce qu'alors la filasse ne consiste plus en longs »rubans« cohérents, mais en fibres séparées dont la longueur n'atteint que 2 cm. environ.

Les faisceaux corticaux se désagrègent toutefois beaucoup plus difficilement que l'écorce, parce que les lamelles intermédiaires des fibres du lin contiennent, outre la *pectose,* encore de la *lignose* [3]) (*lg* fig. 1) qui n'est pas transformée par le rouissage.

Précisément par l'absence de lignose, l'écorce est attaquée beaucoup plus facilement que les faisceaux corticaux, au point que ces derniers, quand le rouissage est bien conduit, restent cohérents et se laissent détacher en entier par le taillage.

L'art du rouissage est donc de laisser le processus aller jusqu'à un certain point et de ne pas le dépasser.

---

[1]) Le nom »pectose« est employé ici dans son sens le plus étendu; il comprend notamment aussi certaines modifications des parois cellulaires, même à l'état de maturité (voir pag. 437).

[2]) Pour les microbes qui attaquent la cellulose voir Omeljansky, *Centralbl. f. Bacteriol.*, 2e Abt., Bd. 8, p. 193, 1901, et G. van Iterson, *Versl. Kon. Akad. Amsterdam*, 24 avril 1903.

[3]) J. Behrens, Natürliche Röstmethoden. Das Wesen des Röstprocesses vom chemischen Standpunkte. *Centralbl. f. Bacteriol.*, 2e Abt., Bd. 8, p. 161, 1902.

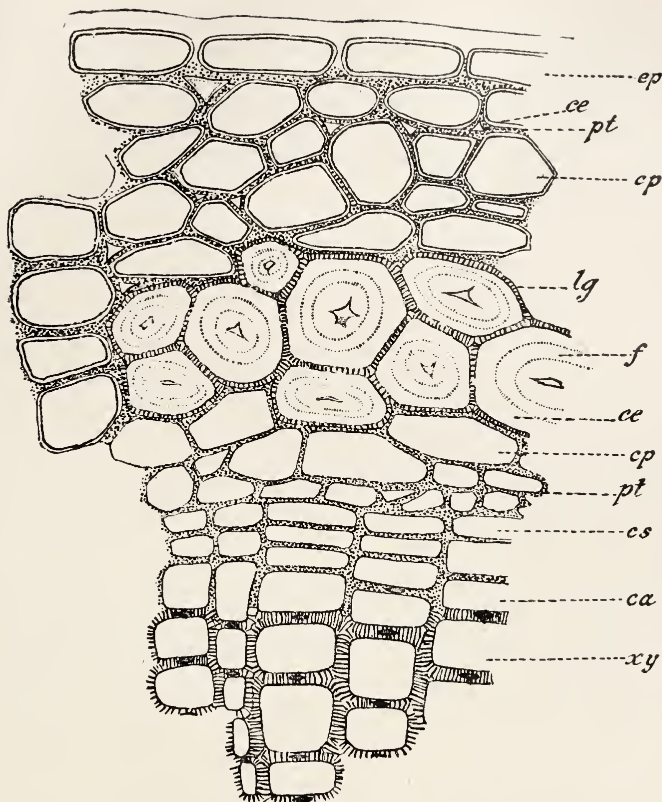


Fig. 1.

Fig. 1 (550). Coupe transversale de l'écorce et du bois d'une tige de lin. La *pectose pt* est pointillée, la *cellulose ce* est restée blanche, la *lignose lg* est hachurée; *ep* épiderme; *cp* cellules corticales primaires avec paroi externe de pectose; *f* fibres corticales avec paroi externe de pectose et de bois; *cs* cellules corticales secondaires et *ca* cellules du cambium dont les parois sont complètement constituées par de la pectose; *xy* bois avec ponctuations, aréolées ou non.

Il n'est toutefois pas aisé, en pratique, de déterminer exactement quel est ce point. La raison en est surtout que les tiges de lin, que l'on a liées en gerbes à l'époque de la récolte, n'ont pas toutes atteint le même degré de maturité. Comme les tiges peu mûres »rouissent« plus facilement que celles dont le degré de maturité est plus avancé et qui sont donc plus dures, le produit que l'on obtient, en les soumettant au même processus, est fort peu homogène. Voilà pourquoi sur les bords de la Lys, aux environs de Courtrai, on se donne beaucoup de peine pour trier le lin autant que possible avant le rouissage, afin d'obtenir des gerbes homogènes. De plus, on y opère le rouissage en deux fois, ce qui permet d'égaliser les différences qui se sont produites dans la première opération.

Nous plaçant au point de vue de la théorie, nous admettons que le rouissage doit continuer jusqu'à ce que le bois (*xy* fig. 1) se détache aisément des faisceaux corticaux (*f* fig. 1) (»rouissage fort«), mais ne peut pas aller aussi loin que ces faisceaux se désagrègent en leurs fibres élémentaires (»rouissage faible«). A cet effet il est nécessaire que l'écorce secondaire (*cs* fig. 1) des tiges de lin se dissolve complètement et que l'écorce primaire (*cp* fig. 1) se sépare en ses cellules [1]).

2. *Pectose et pectine.*

La pectose est un composé calcique, dont la composition n'est pas encore bien connue. Abstraction faite de la teneur en chaux, cette substance est chimiquement voisine de la cellulose, mais n'est pas identique avec elle. D'après MM. Tollens et Tromp de Haas [2]) on trouve, après élimination de la chaux, à peu près la formule $n\ (C^6H^{10}O^5)$ ou $n\ (C^{12}H^{22}O^{11})$; mais pas exactement, car un petit reste de *O* prouve l'existence d'un groupe *COOH*, qui serait toutefois substitué dans la pectose (ces auteurs se servent ici du terme *pectine*). L'acide formant cette combinaison, M. Tollens le tient pour de l'acide gluconique $(C^6H^{12}O^7)$, ou du moins un acide étroitement lié à celui-là, qui se trouverait dans la pectose en combinaison dans une lactone ou un éther, donc à l'état neutre. M. Tollens qualifie la pectose d'oxymucus végétal, mais ne parle pas de la chaux.

Par un traitement acide les diverses formes de pectose sont plus ou moins hydrolysées, mais la pectose du lin subit difficilement cette transformation. Il commence par se former de la pectine ou de la métapectine, substances qui ont un caractère acide et que l'on appelle parfois, pour cette raison, acides pectique et métapectique. La pectine se gélatinise en présence de chaux, sous l'action de l'enzyme pectase, de même que sous l'action des alcalis et de l'ammoniaque, également en présence d'un sel de calcium. Si la chaux fait défaut les combinaisons des alcalis avec la pectine sont solubles dans l'eau. On ne connaît pas une véritable gélatinisation de l'acide métapectique.

Quand l'hydrolyse est plus avancée, la pectine et la métapectine, donc aussi la pectose, forment du galactose et du pentose; d'après M. Tollens certaines espèces de pectine produisent aussi du dextrose et de l'arabinose, tous sucres que *Granulobacter* fait aisément fermenter.

L'ébullition avec de l'acide azotique transforme la pectose et la pectine en acide mucique.

La pectose est insoluble dans l'eau froide, l'eau chaude et l'oxyde cupro-ammoniacal; le chlorure de zinc iodé ne produit pas de coloration bleue. La pectose de la tige

---

1) Il n'est pas certain que cette manière de voir soit exacte (ou plutôt sera reconnue comme exacte quand l'industrie du lin aura cessé d'être une industrie agricole primitive). Puisqu'un bon rouissage ne cause pas le moindre préjudice à la fibre de lin elle-même, on peut se demander si le fileur n'obtiendrait pas des fils d'épaisseur beaucoup plus uniforme en partant des fibres isolées, plutôt qu'en se servant de fibres agglomérées en faisceaux d'épaisseur variable.

2) Untersuchungen über die Pectinstoffe, Liebig's *Annalen der Chemie*, 286, 278, 1895 et Tollens, Ueber die Constitution des Pectins, *Ibid.*, p. 292. Comme l'hydrolyse des substances pectiques donne non seulement du glucose et du galactose mais encore du pentose, M. Tollens donne comme composition possible $(C^6H^8O^4)^{11}C^5H^8O^5$.

du lin est d'ailleurs difficilement attaquable par les acides et les alcalis dilués et ne change pas sous une action de courte durée de la vapeur d'eau surchauffée.

La pectose peut-être ramollie par les actions consécutives d'un acide d'abord, d'un alcali ensuite. Si on laisse macérer les tiges de lin dans une solution diluée d'acide chlorhydrique, qui transforme la pectose en pectine, — cette dernière restant cependant encore, comme une lamelle insoluble, empêchant les cellules de se séparer, — qu'on lave ensuite pour éliminer les sels calciques que l'acide chlorhydrique a rendus solubles, et qu'on traite enfin à l'ammoniaque ou au carbonate de soude, le ramollissement est considérable. C'est sur cette méthode, donnée pour la première fois par M. Mangin[1]), qu'est basé le rouissage chimique patenté par Bauer, un procédé resté sans résultat pratique et prouvant que l'»inventeur« ignorait les conditions auxquelles un lin bien roui doit satisfaire.

Nous sommes parvenus à mieux dissoudre la pectose des tiges de lin en les plongeant dans une solution concentrée d'oxalate d'ammonium; le rouissage n'était toutefois terminé qu'au bout de 3 semaines, de sorte que cette expérience aussi est pratiquement sans valeur.

Tandis que la préparation de la pectose pure est rendue difficile par son insolubilité, il est aisé de préparer de la pectine. A cet effet[2]) on prend par exemple les rhizomes de la *Gentiana lutea* des pharmaciens, on les pulvérise, laisse digérer d'abord dans l'eau et verse ensuite sur la matière ainsi lavée une grande quantité d'une solution de HCl à 3%; après l'y avoir laissé séjourner pendant 24 heures on filtre et on fait précipiter par l'alcool. Après avoir dissous le précipité dans l'eau bouillante, on précipite de nouveau par l'alcool et on répète cette opération jusqu'à ce que toute trace de chlore ait disparu. La pectine que l'on obtient ainsi a une réaction faiblement acide. En solution aqueuse elle se coagule sous l'action de la pectase en présence d'un sel de calcium, ou sous l'action d'un alcali + sel de calcium, en formant une gelée cohérente et transparente.

3. *Le rouissage est produit par des microbes et peut être appelé fermentation de la pectose.*

La dissolution et l'élimination de la pectose de l'écorce de lin s'opère d'une façon complète, et sans que la paroi de cellulose des fibres soit endommagée, sous l'action de quelques espèces de microbes, appartenant aux moisissures et aux bactéries; c'est sur cette action que se basent les méthodes de rouissage ordinaires.

Ce sont des moisissures qui sont les agents actifs dans la méthode de rouissage, très primitive, que l'on applique dans les prés et que l'on appelle »rouissage par la rosée« (dauwroterij); ce sont au contraire des bactéries qui font rouir le lin plongé dans l'eau et produisent le »rouissage blanc« et »bleu« (wit- en blauwroterij).

---

[1]) *Comptes rendus*, 110, 295, 1890. Bien qu'on puisse lire partout que par la méthode de Mangin la pectose passe »en dissolution«, je dois observer que cette assertion est exagérée: il n'est pas question ici d'une désagrégation des tissus en leurs cellules aussi complète que dans le rouissage.

[2]) La recette est de MM. Bourquelot et Hérissey, *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (6). 8, 145, 1898.

Dans le »rouissage par la rosée« il se forme un produit fort peu homogène dont nous ne nous occuperons pas.

Dans le »rouissage bleu« dans des fossés, ainsi que dans le »rouissage blanc«, l'élément actif est une certaine bactérie anaérobie. Cet organisme particulièrement important appartient au genre *Granulobacter;* nous l'appellerons *G. pectinovorum* [1]) (*Gp* fig. 2). Actuellement l'industrie du rouissage n'est plus qu'une méthode de culture plus ou moins rationelle de cette espèce.

A un point de vue théorique il est intéressant de faire remarquer qu'il y a aussi quelques bactéries aérobies qui provoquent le rouissage en plein air. Ce sont diverses espèces de ce groupe de bactéries que l'on appelle les bactéries du foin, et dont les principales sont: *Bacillus mesentericus vulgatus, B. subtilis* et *Granulobacter (Bacillus) polymyxa* (= *B. solaniperda* Kramer); on les connaît aussi sous le nom de »bactéries de la pomme de terre«.

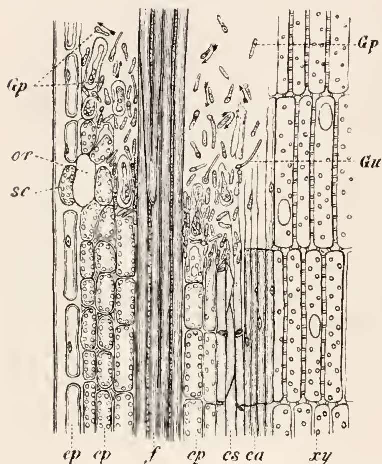


Fig. 2.

Fig. 2 (350). Rouissage observé dans une préparation microscopique, placée dans une goutte d'eau provenant d'un bon rouissage, et qui consiste en une coupe longitudinale de l'écorce et du bois d'une tige de lin. La signification des lettres est la même que dans la fig. 1; en outre: *se* cellule obturatrice d'une stomate; *or* cavité respiratoire dans l'écorce primaire; *Gp Granulobacter pectinovorum*; la vraie bactérie de la pectose; *Gu Granulobacter urocephalum*. On voit l'ecorce primaire *cp* se séparer en ses cellules par la dissolution de la pectose, tandis que l'écorce secondaire *cs* et le cambium *ca* disparaissent complètement.

4. *Expériences de rouissage en petit pour examiner le pouvoir rouissant des microbes en culture pure.*

Afin de déterminer s'il y a moyen de rouir à l'aide de l'un ou l'autre microbe déterminé, on doit disposer d'un lin non roui et complètement stérile. On obtient ce lin en soumettant les tiges pendant quelque temps à une température de 125 à 130° C., dans le stérilisateur à vapeur; ce surchauffage est lui-même sans effet au point de vue du rouissage, et laisse aussi la fibre inaltérée.

[1]) Il a été découvert par M. Winogradsky (*Comptes rendus*, 121, 742, 1895). M. Störmer (*Mittheil. der deutschen Landwirthschafts-Gesellschaft*, 32, 193, 1903) s'est servi du nom *Plectridium pectinovorum*.

Pour les expériences en petit avec les organismes anaérobies, nous avons pris tout simplement de larges tubes à réaction, et nous y avons introduit du lin, lavé ou non à l'eau, en masse suffisamment serrée pour que le frottement contre la paroi de verre l'empêchât de venir flotter à la surface de l'eau dont nous remplissions le tube. Après avoir bouché ces tubes à l'ouate nous les avons mis dans le stérilisateur.

Il est vrai que pendant la culture l'air pouvait s'y introduire par le bouchon, mais quand on prend des tiges de lin assez longues, de 20 cm. p. ex., cet accès de l'air n'est pas désavantageux pour les anaérobies, pourvu que l'on prenne la précaution d'introduire en même temps dans les tubes une espèce vulgaire de microbe aérobie, qui vit à la surface et y absorbe l'oxygène. Dans ce but nous nous sommes toujours servis d'une levure du genre *Torula*.

Pour examiner les microbes aérobies on étend le lin en couche mince au fond d'un large ballon d'Erlenmeyer, et après y avoir versé une couche d'eau peu profonde on stérilise le tout; puis, après refroidissement, on infecte avec l'espèce que l'on veut observer et on cultive à 35° ou à une température plus basse, suivant l'espèce que l'on veut étudier. Au bout de 2 à 3 jours le rouissage est achevé.

En examinant de cette façon les nombreux microbes que nous avons pu isoler du lin en voie de rouissage, le résultat a été négatif pour de beaucoup le plus grand nombre. C'est ainsi que nous avons observé que le rouissage *n'est pas* produit par les diverses espèces de levure alcoolique, de *Mycoderma,* de *Torula,* d'*Oidium* et de levure rouge, ni par les ferments lactiques, les bactéries du vinaigre et les diverses formes du groupe *Aërobacter,* telles que *A. coli* et *A. aerogenes;* tous ces organismes se rencontrent en très grand nombre dans les eaux rouissantes naturelles.

Les espèces aérobies du groupe des bactéries du foin *(B. mesentericus, B. polymyxa* et *B. subtilis)* mentionnées au § 3, au moyen desquelles on peut parfaitement rouir quand l'air a suffisamment accès, sont rares dans une bonne eau de rouissage.

5. *Le rouissage est produit par un enzyme, la pectosinase, sécrété par les bactéries de la pectose.*

L'action sur le lin du *Granulobacter pectinovorum* anaérobie, aussi bien que des bactéries aérobies du foin et des moisissures, est produite par un enzyme spécifique, la *pectosinase* [1]). Cet enzyme exerce, tout comme les acides, une action hydrolysante, transforme d'abord la pectose en pectine, puis la pectine en sucres; ce sont ces derniers qui entrent en fermentation, sous l'influence de *G. pectinovorum* *(Gp* fig. 2), en formant de l'hydrogène, de l'anhydride carbonique et un peu d'acide butyrique. Par les bactéries du foin ils sont assimilés et transformés par la respiration ordinaire.

D'après ce qui précède il s'agit ici du galactose et du xylose, et peut-être, dans quelques cas, du glucose et de l'arabinose qui, comme nous l'avons vu tantôt, ont été

---

[1]) Cet enzyme n'est pas identique avec la »pectinase« de MM. Bourquelot et Hérissey *(Comptes rendus,* 127, 191, 1898; *Journ. de Pharm. et de Chimie,* (6), 10 145, 1898) du moût vert, car on ne peut pas rouir le lin avec ce produit, mais la pectinase de ces auteurs est certainement identique avec la »cytase« de M.M. Brown et Morris (*Journ. Chem. Soc. Trans.*, 1890, p. 458).

trouvés par M. Tollens comme des produits de l'hydrolyse des substances pectiques par des acides.

La pectosinase est difficilement soluble dans l'eau d'où l'on peut la précipiter par l'alcool. En présence de chloroforme et quand les microbes eux-mêmes faisaient défaut, nous sommes parvenus, au moyen de cette substance, à dissocier en leurs cellules de minces plaques de pommes de terre, et à liquéfier des plaques de pectine, préparées en faisant coaguler au moyen de pectase + $CaCl^2$ une pectine extraite de *Gentiana lutea* (voir § 2). L'action de l'enzyme isolé est faible, beaucoup plus faible que quand les bactéries qui le sécrètent sont elles-mêmes présentes à l'état vivant. C'est ce qui résulte p. ex. de la facilité avec laquelle les bactéries du foin désagrègent à 37° C. des plaques de pommes de terre vivantes, tandis que cette désagrégation s'opère difficilement par l'enzyme, que ces bactéries mettent en liberté, préparé chimiquement.

L'étude de la pectosinase est rendue très difficile par l'insolubilité de cette substance dans l'eau, et encore plus par la façon rapide et apparemment capricieuse dont toutes les bactéries de la pectose, que nous avons examinées, perdent le pouvoir de la mettre en liberté. D'une grande importance est surtout la propriété suivante de l'enzyme, en rapport avec cette autre de la bactérie elle-même, productrice aussi bien de l'enzyme que de l'acide.

Tandis que l'action de la pectosinase est favorisée par la présence d'un peu d'acide, la croissance de la bactérie de la pectose est par là ralentie.

Pour ce qui regarde le processus du rouissage même, dont le but immédiat est évidemment la *production* de l'enzyme, on a à tenir compte surtout, si pas exclusivement, des propriétés et spécialement des circonstances de *production* des microbes eux-mêmes. A ce point de vue l'acidité, ou plus exactement la formation d'acide la plus faible possible sera donc favorable au processus.

Il résulte de ce qui précède que la question principale dans le rouissage est celle-ci: Quelles sont les conditions vitales des bactéries actives, et de quelle manière peut-on en obtenir, dans les tiges de lin, une multiplication et une accumulation telles que les autres microbes sont refoulés, et que le processus s'accomplit régulièrement, grâce à la formation d'une quantité suffisante de pectosinase, sans accumulation d'acide?

Il est vrai que M. Winogradsky à déjà donné en partie une réponse à cette question, par la découverte de la bactérie de la pectose. Mais le point le plus important dans l'arrangement d'une épreuve de rouissage, savoir le renouvellement de l'eau, lui a échappé. *Il n'existe donc pas, en ce moment, d'indications nettes relativement aux moyens qui permettent d'arriver à une accumulation naturelle, dans les tiges de lin, des bactéries spécifiques du rouissage, et pas davantage quant à la façon dont ce processus peut être dirigé rationnellement.*

C'est cette lacune que nous allons maintenant combler.

6. *Expérience à circulation d'eau pour l'explication du rouissage.*

Une éprouvette *A* (fig. 3) est complètement remplie de lin *V*, au point que, par frottement les unes contre les autres et contre la paroi de verre, les tiges ne peuvent remonter à la surface de l'eau avec laquelle on remplit l'éprouvette. On obtient ainsi 5 à 10 parties en poids de lin sur 100 p. d'eau.

Un tube de verre *B* pénètre jusqu'au fond du verre *A* et sert à amener de l'eau pure, venant d'un réservoir *C* placé à une certaine hauteur. Cette eau filtre en s'élevant à travers les tiges de lin à mesure que l'eau provenant du lavage s'écoule par *D*; cette eau enlève ainsi la plupart des substances solubles, tandis que *la pectose insoluble reste dans les tiges.* Ce qui s'écoule en *D* peut être appelé l'»eau de rouissage« (root-water). Au commencement de l'expérience elle contient beaucoup de substances dissoutes et peu de bactéries, et diffère donc considérablement de l'eau qui découle plus tard, et qui contient au contraire beaucoup de bactéries et peu de corps dissous.

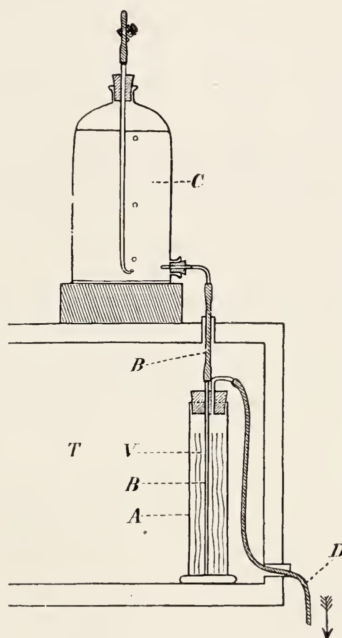


Fig. 3. Appareil pour rouissage dans un courant d'eau. *A* éprouvette avec lin *V*, *B* tube par lequel l'eau qui vient du réservoir *C* arrive au fond de *A*, *D* tube abducteur, *T* thermostat.

Fig. 3.

L'éprouvette *A* est placée dans un thermostat *T*, qui la maintient à une température de 28 à 35° C.

Quand on retire le lin de l'éprouvette au bout de 2 à 3 jours, on constate que le rouissage est plus ou moins parfait quand le courant d'eau a été suffisant pour renouveler l'eau de l'éprouvette cinq à dix fois. Comme notre éprouvette contenait 300 cm³., il fallait y laisser passer 1,5 à 3 litres. Dans ces expériences en petit il est bon de faire arriver le courant d'eau au fond du tube et de laisser s'écouler les couches supérieures, afin d'empêcher que les gaz de la fermentation ne bouchent les tubes; *un pareil procédé serait défectueux dans les expériences en grand, où l'eau du lavage, étant plus lourde, doit être enlevée par en-dessous.*

Quand on examine au microscope l'écorce rouie, ou bien encore la moëlle, ou le liquide contenu dans la tige, on y trouve une accumulation de la bactérie caractéristi-

que, mentionnée plus haut, *Granulobacter pectinovorum* (Planche, fig. 1); elle a refoulé pour ainsi dire tous les autres microbes et remplit littéralement les espaces entre les cellules (*Gp* fig. 2); en plusieurs endroits elle recouvre complètement la surface des fibres et a fait dissoudre totalement les cellules à parois minces de l'écorce secondaire, de sorte que les faisceaux corticaux ont été tout à fait détachés du bois. Une solution d'iode colore cette bactérie en bleu presque sur toute sa longueur, par suite de la granulose qu'elle contient.

C'est un organisme anaérobie. L'expérience précédente, où un courant d'eau aérée lave continuellement les tiges de lin, prouve cependant que son développement n'est pas arrêté par une quantité d'air assez considérable; un examen plus minutieux a même appris qu'ici comme dans d'autres cas d'anaérobiose une aération modérée, loin d'être désavantageuse, est bienfaisante et même nécessaire à la longue pour que la croissance continue.

Comme nous avions observé qu'aux environs de Courtrai et à Courtrai même l'eau de la Lys était fortement chargée d'acide sulfhydrique, nous avons cru intéressant d'ajouter à l'eau, qui devait servir au rouissage, environ 50 mgr. de H^2S par litre; cela suffisait pour qu'il restât encore un peu de H^2S dans l'eau provenant de l'expérience. Nous avons pu nettement constater qu'il en résultait un ralentissement du processus, qui était aussi moins parfait que quand il n'y avait pas d'hydrogène sulfuré; le *G. pectinovorum* s'était néanmoins fortement accumulé.

Toute autre était l'influence de KNO^3. Quand nous ajoutions cette substance à l'eau d'expérimentation à raison de 0,2 gr. par litre, nous en retrouvions encore une trace dans l'eau d'écoulement. Dans ce cas l'accumulation de *G. pectinovorum* et le rouissage étaient parfaits. Aussi M. Plaisier, commerçant en lin à Hendrik Ido Ambacht, au jugement duquel nous avons soumis les échantillons de nos lins rouis, a-t-il trouvé notre lin au salpètre »excellent«. Mais il va de soi que les bonnes eaux à rouissage sont ordinairement tout à fait exemptes de nitrates.

En réalité, dans notre expérience de rouissage, l'accumulation repose non seulement sur l'aération, nécessaire quoique faible, mais encore sur cette circonstance que *le courant lave le lin pendant les 24 premières heures d'une façon si efficace, que les combinaisons azotées solubles sont presque complètement éliminées et qu'il ne reste que l'albuminoïde protoplasmique, difficilement soluble, des cellules du lin; avec les hydrates de carbone encore présents et la pectose, cette matière albuminoïde est précisément la nourriture par excellence de G. pectinovorum, et aussi la nourriture requise pour produire la sécrétion de pectosinase et mettre en train le processus du rouissage.* Si ce lavage n'a pas eu lieu, c. à d. si l'on fait cette expérience sans courant d'eau, on observe bien un développement considérable de toutes espèces de bactéries, mais *les deux premiers jours* il ne se produit pas une véritable accumulation de *G. pectinovorum* et le rouissage n'a pas lieu, ou a lieu beaucoup plus imparfaitement.

Le raison de ce phénomène, très remarquable, doit être cherchée exclusivement dans une concurrence entre diverses espèces de microbes. C'est ce qui résulte du fait que, sans renouveler l'eau, on peut parfaitement rouir le lin à l'aide d'une culture pure de *G. pectinovorum.* Il suit de là que les substances éliminées du lin par l'eau courante ne sont pas elles-mêmes nuisibles pour *G. pectinovorum,* mais elles favorisent la croissance des autres espèces, particulièrement des micrococques lactiques, dont la multiplication dans »l'eau de rouissage« un peu concentrée est si rapide que *G. pectino-*

vorum ne peut se développer que difficilement et trop tard. Mais de plus il est bien établi que dans un liquide dilué la sécrétion de pectosinase est plus abondante que dans une solution nutritive plus concentrée. Ainsi par exemple, nous ne sommes pas parvenus à rouir le lin en le plaçant dans un extrait de moût, dilué et stérilisé, indiquant environ 2⁰ au saccharimètre de Balling, mélangé de craie et subissant une fermentation rapide sous l'action d'une culture pure de *G. pectinovorum*. Il paraît donc que dans des conditions nutritives aussi favorables la pectosinase ne se forme pas du tout.

Il y a donc une double raison pour laquelle le lessivage est favorable au rouissage: la bactérie de la pectose devient prépondérante et la sécrétion de pectosinase est activée.

Si l'on compare l'image microscopique des bactéries du lin (Pl. fig. 1), roui suivant notre »expérience à circulation«, avec celle des bactéries obtenues de la manière ordinaire, c. à d. par le rouissage »blanc« ou »bleu«, on est frappé de la grande différence entre les deux préparations. Dans le dernier cas on ne voit pour ainsi dire que les espèces qui rendent la culture impure, et l'on a de la peine à découvrir le *G. pectinovorum;* dans l'expérience à circulation d'eau *G. pectinovorum* semble se trouver en culture presque pure [1]).

7. *Simplification de l'expérience précédente.*

Quand nous eûmes établi la grande importance du lavage des tiges de lin et de l'aération pour le processus du rouissage, nous avons cherché à remplacer la »méthode de circulation« par un procédé de renouvellement de l'eau plus rationnel et plus pratique.

Nous y sommes parvenus de la manière bien simple que voici.

Après avoir laissé l'eau séjourner sur le lin pendant 24 heures, nous l'avons déversée complètement, de manière à laisser les espaces entre les tiges se vider et permettre à l'air d'y pénétrer. Nous y avons ensuite versé de l'eau fraîche d'environ 30⁰ C., ou bien une bonne eau de rouissage provenant d'une opération antérieure. En employant de l'eau fraîche, nous constations qu'il était recommandable de répéter le renouvellement toutes les 24 heures, mais, quand nous disposions d'une bonne eau de rouissage, un second renouvellement était déjà superflu, parce que cette eau contenait déjà une quantité suffisante de *Gr. pectinovoroum.*

Cette méthode d'opérer, que l'on pourrait appeler »méthode de déversement«, fournissait également des échantillons excellents de lin roui au bout de 2½ à 3 jours. Elle semble même avoir sur la méthode de circulation, dans une application en grand, cet avantage que par le déversement l'eau de rouissage concentrée est enlevée beaucoup plus complètement aux interstices entre les tiges que par le lent déplacement du courant d'eau. Pour la même raison l'*aération* sera plus complète, en tous les points des gerbes de lin, par »déversement« que par »circulation«.

Nous basant sur l'expérience ainsi acquise, nous pouvons donc être certains que toute autre méthode de renouvellement de l'eau, garantissant une aération et un lessivage suffisants, pourra remplacer les méthodes de »circulation« et de »déversement«,

---

1) Voir aussi § 12.

à condition que l'on ait soin de ne pas endommager les tiges de lin, si frêles et si aisément blessées pendant le rouissage.

C'est le moment de faire remarquer encore une fois que, bien que *G. pectinovorum* appartienne aux bactéries anaérobies obligatoires, l'aération relativement forte dont il vient d'être question est pourtant réellement favorable à son développement. Cela est du reste pleinement d'accord avec l'expérience acquise avec tous les autres organismes anaérobies bien étudiés. Chaque nouvelle recherche prouve donc, avec une évidence de plus en plus grande, que les organismes anaérobies dans le sens strict du mot n'existent pas, et que la manière dont ces êtres se comportent vis à vis de l'oxygène libre est mieux rendue par le terme »microaérophilie« que par celui d'»anaérobiose«.

8. *Application de notre expérience dans l'industrie du rouissage* [1]).

En pratique le rouissage a lieu jusqu'ici d'une façon très primitive. Même sur les bords de la Lys, près de Courtrai, d'où viennent au marché les meilleures fibres de lin, un observateur même peu attentif est frappé des mauvaises conditions dans lesquelles on travaille et des fautes que l'on commet.

Une première tentative d'amélioration a été faite dans notre pays, en 1893, par la Société pour l'Industrie Liniaire Néerlandaise, qui a tâché de remplacer le rouissage en eau libre, par le rouissage »en cuve«.

Cette méthode consiste à placer les gerbes de lin, verticalement et serrées les unes contre les autres, dans une grande cuve en bois, présentant à quelque distance du fond une cloison en tamis, sur laquelle repose le lin et sous laquelle peut se rassembler l'eau de lavage, qui descend par son propre poids quand la cuve a été complètement remplie d'eau.

De même M. le baron Rengers, à Oenkerk, a essayé d'améliorer le rouissage du lin en opérant suivant le »procédé à l'eau chaude«. Dans ce procédé les gerbes de lin sont placées dans une marmite en fer, complètement fermée, que l'on remplit d'eau tiède (28° à 35° C.); le rouissage y serait accompli en trois jours.

Le rouissage »en cuve« de même que celui »à l'eau chaude« ne peuvent toutefois s'effectuer avec succès, que si l'on soigne en même temps pour un renouvellement convenable de l'eau; ce renouvellement est possible de diverses manières, mais on n'en a pas suffisamment tenu compte jusqu'ici.

Le rouissage »en cuve« présente les avantages suivants.

1°. Les cuves peuvent être placées dans les bâtiments d'une fabrique, où peuvent aussi s'effectuer les autres manipulations que le lin doit subir.

---

[1]) Le rouissage »en cuve« empêche le blanchiment du lin à la lumière, une opération très importante dans le rouissage »blanc«, combiné jusqu'ici avec séchage à l'air libre et au soleil. A l'avenir, dans les établissement liniaires, on devra donc avoir recours à un procédé de blanchiment chimique. Des expériences ont appris qu'on pourra se servir à cet effet d'ozone ou d'eau oxygénée. Des déterminations de solidité au dynamomètre devront apprendre s'il y a moyen d'employer des hypochlorites (»blanchiment électrique«) sans affaiblir les fibres. Grâce au concours bienveillant de MM. les Proff. Kraus et van der Burg, l'Ecole Polytechnique de Delft dispose des appareils nécessaires pour ce genre d'expériences. Il est évident que le rouissage »en cuve« aura comme conséquence qu'on s'occupera de la fabrication de bons appareils de séchage et de plus d'une difficulté *que l'industrie mettra un certain temps à vaincre.*

2°. La température de l'eau destinée au rouissage peut être réglée à volonté, ce qui fait disparaître la différence entre les méthodes de rouissage en cuve et à l'eau chaude. Le rouissage peut d'ailleurs s'opérer toute l'année.

3°. Il est facile de régler le lessivage et l'aération du lin, ce qui assure l'accumulation et la multiplication de la bactérie de la pectose, tout en écartant *les microcoques de la fermentation lactique, les grands ennemis de l'industrie liniaire.*

Ce qui précède permet de prévoir quelles sont les conditions théoriques auxquelles le rouissage en cuve doit satisfaire en général; il est bon toutefois d'insister encore sur les points suivants, d'où dépend le succès ou l'insuccès de l'opération.

En premier lieu, on doit faire en sorte que l'eau plus dense, qui résulte du lavage du lin, puisse être aisément enlevée. Quand on emploie une cuve à double fond, elle se rassemble sous le lin; on peut donc commencer par remplir la cuve complètement d'eau, laisser reposer pendant 24 heures, puis laisser toute l'eau s'écouler. De cette manière le lin vient en contact avec l'air d'une façon très uniforme, et toutes les parties des gerbes, même les plus serrées, sont convenablement aérées (»méthode de déversement«).

Il suffit de renouveler l'eau une seule fois [1]).

On commet une faute grave en laissant s'écouler par en-dessus l'eau provenant du lavage et introduisant l'eau fraîche par en-dessous. De cette manière, en effet, on ramène l'eau du lavage entre tiges de lin: de plus, on empêche ainsi un lessivage uniforme parce que l'eau ascendante suivra évidemment les voies où la résistance est la plus faible, c. à d. les intervalles entre les gerbes, et ne pénètrera pas dans les endroits les plus serrés où sa présence est surtout nécessaire. En opérant de cette façon, on entrave donc la croissance de la bactérie de la pectose, tout en favorisant celle des ferments lactiques. De plus l'aération, qui a lieu pour ainsi dire d'elle-même et partout uniformément par un déversement complet de l'eau de lavage, deviendrait par là très irrégulière et imparfaite.

En second lieu, il ne suffit pas, après le premier déversement, de remplir la cuve d'eau fraîche, mais on doit y ajouter une grande quantité d'une *bonne* eau de rouissage, provenant d'une opération antérieure, afin d'introduire partout dans le lin les bactéries de la pectose; le lin n'apporte par lui-même qu'un petit nombre de ces microbes, qui ne sont pas du tout universellement répandus, ni sur le lin, ni dans les eaux.

Avant d'avoir à sa disposition une bonne eau de rouissage, il sera nécessaire de renouveler l'eau une seconde fois après 24 heures, donc deux jours après le remplissage de la cuve, et de la remplacer par de l'eau fraîche. On peut faire cette seconde opération en toute sécurité, car au bout de deux jours les bactéries se sont déjà accumulées en telle quantité dans les tiges de lin que le second lavage ne les enlève qu'en partie.

Combien il est aisé d'obtenir une bonne eau de rouissage, cela résulte de la description de l'expérience à circulation d'eau (§ 6).

---

[1]) Les expériences faites avec des cultures pures de la bactérie de la pectose ont prouvé qu'en théorie il n'est même pas nécessaire de renouveler l'eau complètement; mais il est probable que par le rouissage en cuve, entrepris en grand, l'état idéal ne pourra jamais être atteint par suite de la concurrence d'autres organismes particulièrement des ferments lactiques et butyriques, qui tendent à refouler la bactérie de la pectose.

En troisième lieu, il sera nécessaire de régler avec soin la température. Nos expériences en petit ont montré que la température la plus favorable est comprise entre 28° et 35° C. Au bout de 2½ à 3 jours on retire alors des cuves un lin roui de qualité excellente (voir la note au bas de la p. 431). Il se peut qu'en prolongeant la durée du rouissage on puisse abaisser la température jusqu'à 25° ou 27° C. Les résultats pratiques devront nous apprendre s'il a là quelque avantage.

9. *Culture pure de la bactérie de la pectose.*

La culture pure de *G. pectinovorum,* espèce de *Granulobacter* qui, comme toutes les autres, produit des spores, réussit sans trop de peine de la manière suivante.

Dans une boîte de verre on prépare un terrain de culture, composé d'extrait de moût dilué d'environ 2° Balling avec 2% d'agar et 2% de craie; sur ce terrain on étend un peu de matière enlevée à l'écorce d'une tige de lin, bien rouie et pasteurisée à 90° C., afin d'obtenir des colonies en traits de *G. pectinovorum.* La pasteurisation est nécessaire pour tuer les bactéries concomitantes, qui ne produisent pas de spores, particulièrement les ferments lactiques; elle ne peut toutefois s'effectuer à une température trop élevée, parce que la plupart des spores de la bactérie de la pectose meurent elles-mêmes au point d'ébullition de l'eau.

On place la boîte de verre dans un exsiccateur bien clos avec robinet à trois voies, où l'on met en outre une écuelle d'hydrosulfite alcalin. On évacue l'exsiccateur à la trompe et on le remplit d'hydrogène (ou d'acide carbonique), puis on évacue de nouveau et on répète cette opération jusqu'à ce que l'on puisse admettre que l'oxygène, que l'on n'enlève jamais entièrement, a atteint le minimum de pression que les bactéries anaérobies peuvent supporter; c'est du reste aussi dans le but de diminuer cette pression que nous introduisons l'hydrosulfite. L'exsiccateur est placé dans un thermostat d'environ 35° C.; au bout de 2 à 3 jours on voit les colonies des anaérobies se développer suivant les traits inoculatoires.

Ces colonies appartiennent surtout aux quatre espèces suivantes de *Granulobacter:*

1. *G. pectinovorum*
2. *G. urocephalum*
3. *G. saccharobutyricum*
4. *G. butylicum;*

j'ai donné son nom à la troisième espèce et j'ai décrit la quatrième dans un travail antérieur [1]). Seules les deux premières espèces, *G. pectinovorum* et *G. urocephalum,* sont de véritables bactéries du rouissage; la première est très active, la seconde l'est beaucoup moins. Les deux autres espèces, les ferments butyrique (*G. saccharobutyricum*) et butylique (*G. butylicum*) ne rouissent pas du tout. Les colonies de ces quatre espèces se colorent en bleu foncé quand on y verse une solution d'iode, par suite de la granulose qu'elles contiennent. De plus, dans toutes les colonies on trouve des bâtonnets qui ne se colorent pas en bleu par l'iode et que j'ai décrits, à une autre occasion [2]), comme »formes à oxygène« de *Granulobacter.* Quelques-unes des colonies

---

[1]) Sur la fermentation et le ferment butyliques; ces *Archives,* 29, 1. 1896.

[2]) *Ibidem,* p. 35.

sont même exclusivement constituées par cette forme, ne se colorent pas en bleu par l'iode, et ne contiennent pas de clostridies, mais seulement des bâtonnets où l'on trouve rarement des spores.

Si l'on n'a pas pris soin de pasteuriser la matière empruntée aux tiges de lin et employée pour la semence, il se forme sur les plaques, parmi plusieurs autres espèces, particulièrement des colonies de microcoques lactiques, dont les dimensions sont beaucoup plus fortes que celles des colonies de *Granulobacter* et qui sont par là facilement reconnaissables.

10. *Description de Granulobacter pectinovorum.*

Sur le terrain de culture, décrit § 9, les colonies de *G. pectinovorum* sont faciles à reconnaître par le »phénomène du moiré«, représenté sur la planche, fig. 3. Il consiste en ceci que, quand on laisse tomber la lumière obliquement à travers la colonie,

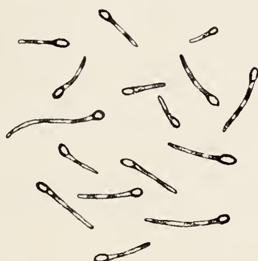


Fig. 4.

Fig. 4 (650). Culture de *Granulobacter pectinovorum* dans une solution de pectine et de sulfate d'ammonium. Les extrémités epaissies contiennent des spores oblongues; les parties sombres des bâtonnets indiquent de la granulose.

on observe des champs singuliers, presque rectangulaires, sombres ou clairs, dont la teinte peut varier ce qui provient d'une réflexion sur des groupes de bactéries, où les individus sont parallèles entre eux tandis que les axes des groupes sont à peu près perpendiculaires.

Quant à la bactérie elle-même, la description qu'en donne M. Winogradsky [1]) correspond parfaitement à mes observations. C'est une espèce assez grande, produisant des spores dans une dilatation voisine d'une extrémité, mais non à l'extrémité même, ce qui la fait ressembler à la larve d'une grenouille (Pl. fig. 2). La longueur des bâtonnets est de 10 à 15 μ et l'épaisseur 0,8 μ; ces bâtonnets peuvent cependant devenir beaucoup plus longs; les vieux individus deviennent plus épais et se dilatent jusqu'à 3 μ à quelque distance de l'extrémité; la spore oblongue, qui se forme dans cette dilatation, mesure 1,8 μ sur 1,2 μ.

Dans un extrait de moût dilué et à l'abri de l'air il s'opère une vive fermentation, mais sans formation d'acide butyrique.

Avec l'amidon [2]), l'inuline, la mannite, l'érythrite, la glycérine et la gomme arabique on n'obtient point de fermentation.

---

[1]) *Comptes rendus*, 121, 744, 1895.

[2]) M. Winogradsky dit au contraire que l'amidon entre en fermentation.

Avec la peptone ou un bouillon de viande dilué, ou encore avec de l'albumine comme source d'azote, notre bactérie fait fermenter le glucose, le lévulose, le galactose, le sucre de lait et le maltose, et il se forme alors un peu d'acide butyrique. Les substances albuminoïdes et la gélatine sont peptonisées.

En employant l'ammoniaque comme source d'azote nous n'avons pas pu faire fermenter ces sucres dans les cultures pures.

La pectine préparée comme au § 2 se décompose quand on prend de l'albumine, de la peptone ou du bouillon de viande, et même, quoique difficilement, avec de l'ammoniaque comme source d'azote; par là la bactérie occupe une place à part et se distingue nettement d'autres organismes, surtout des ferments butyrique et butylique, qui n'attaquent pas du tout la pectine. Cette décomposition est accompagnée d'une sécrétion de pectosinase.

G. pectinovorum n'attaque pas du tout la cellulose dans sa forme resistante, soit p. e. comme papier à filtrer, soit comme précipité amorphe. Aussi le rouissage n'a-t-il pas la moindre influence sur la fibre de lin elle-même. Au contraire la cellulose de moindre résistance, comme celle des racines comestibles, p. e. des navets et du choux-rave, est difficilement mais indubitablement dissoute et fermentée. Mais, quoique cette substance se colore en bleu par l'iode en présence du chlorure de zinc, il est difficile de la différencier nettement de la pectose, à laquelle elle se rattache par toute une série de corps intermédiaires.

Ainsi qu'on peut s'en assurer sur la photographie (Pl. fig. 2), l'image fournie par la culture pure sur de l'extrait de moût à l'agar, est tout à fait différente de celle du ferment butyrique, qui donne des clostridies courtes et épaisses.

Il en est de même dans les liquides de culture. La fig. 4 ci-contre représente la bactérie de la fermentation de la pectine de rhizome de gentiane à 35° C. dans:

Eau de conduite	100
Pectine	2
$(NH^4)^2SO^4$	0,05
K^2HPO^4	0,05
Craie	2.

Les parties sombres indiquent les endroits où s'est accumulée la granulose. Les clostridies, toujours peu développées dans cette espèce, font ici complètement défaut. La forme de notre bactérie, dans ce liquide de culture et dans d'autres du même genre, est caractéristique, et ne se retrouve que chez *G. urocephalum*.

11. *Description de Granulobacter urocephalum.*

La différence entre *G. pectinovorum* (*Gp.* fig. 2, Pl. fig. 3) et *G. urocephalum* (*Gu* fig. 2, Pl. fig. 4), qui s'accumule aussi, quoique en moins grande quantité, dans le lin rouissant, consiste d'abord dans la forme, — celle de *Urocephalum* rappelant un bâton de tambour, bien que là aussi la spore ne soit pas ronde, mais oblongue, comme on peut le voir nettement sur la fig. 2 du § 3. Puis, la première espèce sécrète une quantité bien plus grande de l'enzyme pectosinase que *G. urocephalum*, et c'est de là que provient la présence beaucoup plus générale de *G. pectinovorum* dans le lin rouissant. Leur nom indique déjà que les deux espèces se colorent en bleu par l'iode.

Voici encore une différence caractéristique entre les deux. Quand on les conserve sur des plaques d'agar avec extrait de moût dilué et craie, les colonies de *G. pectinovorum* (Pl. fig. 2) passent bientôt à l'état de détritus, dans lequel les spores seules sont encore nettement reconnaissables, les colonies de *G. urocephalum,* au contraire, restent beaucoup plus longtemps intactes et les bactéries y conservent nettement leur forme. Ce phénomène de bactériolyse a probablement quelque rapport avec la sécrétion de pectosinase; on l'observe aussi chez les bactéries du foin.

Mais la différence principale entre *G. urocephalum* et *G. pectinovorum,* c'est qu'avec des sels d'ammonium comme source d'azote la première des deux espèces peut faire fermenter toute espècc d'hydrates de carbone, tels que glucose, le sucre de lait, le sucre de canne et la dextrine, alors que *G. pectinovorum* exige pour cette fermentation de la peptone ou du bouillon de viande. Par contre *G. urocephalum* attaque la pectose d'une façon si peu vive qu'on n'observe pas de fermentation, même quand on prend du bouillon comme source d'azote. Chez *G. urocephalum* la formation de trypsine est presque tout aussi vive que chez *G. pectinovorum* et beaucoup plus vive que chez *G. saccharobutyricum.* La sécrétion de diastase est nulle chez *G. pectinovorum* et chez *G. urocephalum* elle est très faible, beaucoup plus faible même que chez le ferment butyrique.

Les deux espèces produisent beaucoup de mucus végétal qui provient des parois épaissies et liquéfiées des bactéries elles-mêmes; on le retrouve dans le résidu que l'on obtient par l'évaporation de l'eau provenant du rouissage. Ce résidu contient encore de la pectine et évidemment les bactéries elles-mêmes, qui en constituent la plus grande partie.

12. *Expérience d'accumulation de G. urocephalum. Pourquoi les ferments butyrique et lactique disparaissent dans un bon rouissage.*

La forte accumulation de *G. pectinovorum* dans nos expériences de »circulation« et de »déversement« est la conséquence d'une double adaption de ce ferment: il est adapté d'une part aux albuminoïdes insolubles de la tige de lin par son fort pouvoir peptonisateur, d'autre part à la pectose insoluble par la sécrétion de pectosinase.

La raison pour laquelle *G. urocephalum* aussi se multiplie dans le lin, quoiqu'à un moindre degré, et celle pour laquelle le ferment butyrique, pourtant si répandu et si résistant, disparaît, ont été fournies par la méthode suivante d'accumulation de *G. urocephalum,* trouvée par M. G. van Iterson lors d'une recherche sur la fermentation butyrique.

Quand on ajoute à l'un ou l'autre carbohydrate, p. ex. à de l'amidon soluble, du glucose, du saccharose ou du sucre de lait, une très petite quantité d'albumine ou de peptone, ou encore un peu de bouillon de viande, comme source d'azote, — p. ex. dans le rapport:

Eau de conduite	100
Glucose	5
Albumine	0,1
K^2HPO^4	0,05
Craie	5,—

que l'on infecte ensuite au moyen de terreau, et que l'on cultive à 35° dans un flacon fermé, il commence par se produire il est vrai une fermentation butyrique propre produite par *G. saccharobutyricum,* notamment aussi longtemps qui'il y a encore dans le liquide des combinaisons azotées solubles; mais bientôt elle est remplacée par une fermentation due à *G. urocephalum,* qui produit de l'acide butyrique en moindre quantité et se laisse reconnaître aisément au microscope.

Quand on effectue un transport du liquide en fermentation dans le même liquide frais, le ferment butyrique ne disparaît pas entièrement, il est vrai, mais le caractère spécifique de la fermentation à *Urocephalum* devient néanmoins plus convaincant. Si l'on ajoute à la matière, lorsque la fermentation est terminée, une nouvelle quantité de sucre (et de craie), on constate que la purification du ferment va encore plus loin.

En employant moins de sucre, on trouve que les composés azotés solubles, présents p. ex. dans l'albumine, deviennent gênants parce qu'ils favorisent le développement du ferment butyrique.

Si l'on répète cette épreuve, en remplaçant l'albumine par un sel ammoniacal, *G. urocephalum* disparaît totalement et le ferment butyrique, *G. saccharobutyricum,* reste maître du terrain.

Que ce résultat est tout simplement un effet de la concurrence entre les deux organismes, on en trouve la preuve dans le fait, qu'en culture pure et avec les deux sucres qui viennent d'être nommés et un sel ammoniacal comme source d'azote *G. urocephalum* croît parfaitement et produit une forte fermentation. Une culture pure sur une gélatine à extrait de moût dilué a du reste appris que, tout comme *G. pectinovorum, G. urocephalum* liquéfie la gélatine beaucoup plus fortement que le ferment butyrique; il sécrète donc plus de trypsine.

Voici donc la raison pour laquelle, dans l'expérience de circulation, ces trois bactéries s'accumulent dans le lin d'une façon aussi inégale, et en même temps pourquoi *G. urocephalum* tient le milieu entre la bactérie de la pectose et le ferment butyrique:

Le lavage enlève les combinaisons azotées solubles et les microbes n'ont plus à leur disposition que l'albumine végétable insoluble. Cela assure le triomphe de *G. pectinovorum* et de *G. urocephalum,* deux bactéries fortement peptonisantes, sur le ferment butyrique qui ne possède pas cette facculté ou ne l'a qu'à un faible degré.

Le ferment butyrique sécrète beaucoup plus de diastase que *G. pectinovorum* et *G. urocephalum;* aussi longtemps que ce ferment est présent, il est donc une source certaine de sucre, puisque la fécule ne fait jamais complètement défaut.

Dès que le ferment butyrique a disparu, les hydrates de carbone solubles sont rapidement éliminés par le lavage et la fermentation, et il ne reste plus alors que la pectose insoluble, ce qui fait que *G. pectinovorum,* qui sécrète beaucoup de pectosinase, l'emporte finalement aussi sur *G. urocephalum* qui en produit peu ou n'en produit pas.

Les micrococques lactiques ne produisent pas d'enzyme capable d'attaquer l'albumine, la pectose ou les hydrates de carbone. Du moment qu'ils n'ont à leur disposition que de l'albumine insoluble et des hydrates de carbone insolubles, ils sont incapables de se multiplier et sont enlevés par le courant d'eau.

Explication de la Planche.

Fig. 1 (600).

Goutte d'eau, exprimée d'une tige de lin soumise au rouissage à »circulation d'eau«, colorée à l'iode. Elle fait voir l'accumulation naturelle de *G. pectinovorum*, très abondant, et de *G. urocephalum*, moins abondant. Çà et là des »formes à oxygène«, non colorables par l'iode.

Fig. 2 (900).

Granulobacter pectinovorum en culture pure sur de l'agar à extrait de moût dilué La granulose est colorée en bleu par l'iode. On voit entre les bactéries beaucoup de détritus formés par bactériolyse.

Fig. 3 (15).

Colonies de *G. pectinovorum* sur le même terrain de culture, présentant le »phénomène du moiré«.

Fig. 4 (900).

Granulobacter urocephalum en culture pure sur de l'agar à extrait de moût dilué. Pas de détritus entre les bactéries.

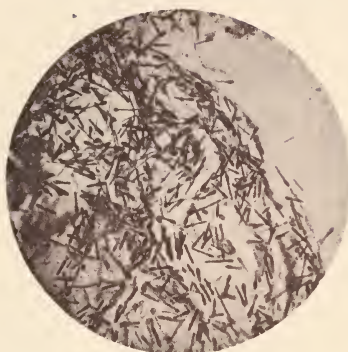


Fig. 1.

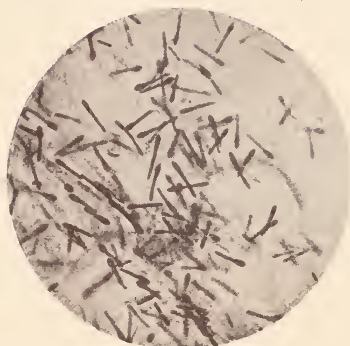


Fig. 2.



Fig. 3.

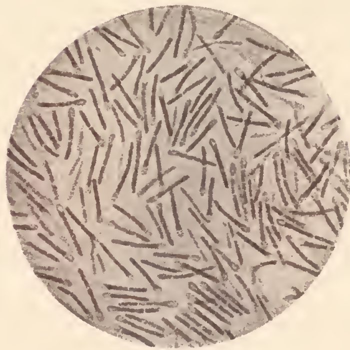


Fig. 4.

Sur les bactéries actives dans rouissage du lin.

Chlorella variegata, ein bunter Mikrobe.

Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais, Nijmegen, Vol. I, 1904, p. 14—27.

Weil der hier zu besprechende Mikrobe einzellig ist, erscheint es auf den ersten Blick widersinnig, dabei von »bunt« zu reden, denn eine einzelne Zelle kann unmöglich zu gleicher Zeit chlorophyllhaltig und chlorophyllos sein. Sobald man jedoch das Bunt als Variationsform auffaßt und den normalen Entwicklungsgang irgend einer Organismenart als eine Reihe nacheinander stattfindender Variationsvorgänge, so wird es auch verständlich, dass ein einzelliger Mikrobe, wobei die Produkte der Zellteilung einander kurz nach deren Entstehung verlassen, in Bezug auf diese Produkte variiren, also z. B. als erblich farblos und erblich grün vorkommen kann, trotzdem doch nur eine einzelne Art vorliegt und der Artbegriff so enge genommen wird wie man will.

Dass der hier angeführte Vergleich ein naturgemässer ist, ergiebt sich aus dem Umstande, dass die meisten Pflanzen durch die Erzeugung farbloser Wurzeln und nicht grün gefärbter Blüthen, deutlich zeigen, dass das Buntwerden ein Variationsvorgang ist, welcher mit ihrer normalen Entwickelung aufs Engste zusammenhängt.

Im vorliegenden Falle handelt es sich um Verhältnisse bei einem Mikroben, welcher die Mitte hält zwischen einer Grünalge und einem Pilze, nämlich um eine Art der sehr einfachen Algengattung *Chlorella*[1]), welche als *C. variegata* bezeichnet werden soll. Zwar kann der farblose Zustand zu der Pilzgattung *Prototheca*[2]) gebracht werden, doch muss der Hauptname sich wohl auf die am reichsten ausgestattete Form beziehen.

Unsere Art lebt im Saftflusse der Ulme und vielleicht auch von anderen Bäumen, welcher Saft herausfliesst wenn die Weidenraupe (*Cossus ligniperda*) sich im Stamme angesiedelt hat. Weil in den umfangreichen dadurch hervorgerufenen Wunden eine zuckerhaltige Flüssigkeit entsteht, welche von Insekten, besonders von Wespen, aufgesucht wird, kann es nicht wundernehmen, dass darin eine Alkoholgährung zustande kommt, welche eben von jenen Tieren von Baum zu Baum verbreitet wird, wobei auch alle übrigen Mikroben, welche neben den Alkoholhefen vorkommen, an den Beinen der Wespen haften bleiben und ebenfalls verbreitet werden. Besonders durch Professor Ludwig sind wir mit dieser eigenthümlichen Flora bekannt geworden, obschon Ludwig den Saftfluss nicht als primär durch die Weidenraupe verursacht betrachtet, sondern einen parasitischen

---

[1]) Beijerinck, Bot. Zeitung 1890, p. 730.

[2]) W. Krüger, in Zopf's »Beiträge zur Morphologie und Physiologie niederer Organismen«. Heft 4. p. 69. 1894.

Pilz als den Erreger annimmt, was für gewisse Fälle auch wohl richtig sein dürfte, obgleich viele Infektions-Versuche an Eichen und anderen Bäumen, welche ich angestellt habe mit Saftflussmaterial, welches Prof. Ludwig mir gesandt hatte, immer resultatlos geblieben sind.

Auch ist es sicher, dass hier bei Delft nur dann Saftfluss vorkommt, wenn, wie gesagt, eine Raupe den Baum bewohnt und nur daraus habe ich *C. variegata* isoliert. Zwar fand ich einmal bei de Grebbe eine Eiche mit derselben höchst eigenthümlichen Ausschwitzung, welche ich durch Prof. Ludwig schon kannte und die sich durch einen ausserordentlichen Wohlgeruch auszeichnet, welcher entsteht bei der durch *Endomyces magnusii* hervorgerufene Alkoholgärung, doch fehlte *Chorella* darin gänzlich, während andererseits *Endomyces*, wie es scheint nimmer im Saftflusse der Raupenbäume gefunden wird.

Von sehr verschiedenen Bäumen aus der Provinz Gelderland stammendes Saftflussmaterial erhielt ich vor mehreren Jahren durch die Güte von Dr. J. T. Oudemans, Amsterdam, und fand darin drei *Prototheca*- und ebensoviele *Chlorella*-arten, worunter besonders eine sehr schöne und grosszellige *Prototheca*-art[1]) gemein ist. Es hat sich herausgestellt, dass diese nicht nur weit verbreitet in den Baumsäften, sondern auch ein Bewohner des Schlammes unserer Stadtgraben und in gewissen Fällen von menschlichen Faeces ist, worin also auch Chlorellen lebenfähig sein dürften. Ich fand dieselbe jedoch besonders viel im Flusse einer Birke und von einem *Abies pinsapo*.

Auch *Chlorella variegata* war in den aus Gelderland erhaltenen Mustern gegenwärtig, doch isolierte ich das für meine Versuche verwendete Material dieser Art, wie gesagt, hier in Delft aus Ulmenfluss.

Die Isolierung, sowohl von *Chlorella* wie *Prototheca* findet am besten statt durch Aussaat des Rohmateriales auf Biergelatine, welcher Kulturboden gewählt wurde, weil beim Saftflusse eine Art »Bier« entsteht, infolge der Gegenwart der im Flusse niemals fehlenden Alkoholhefen, worunter ganz allgemein einige Glukosehefen, während Maltosehefen darin nicht vorkommen[2]).

Chlorella variegata wurde in dem bunten Mikrobengemisch durch folgende Eigenthümlichkeit erkannt: Die anfangs vollständig farblosen Kolonien, welche ganz wie Hefe-Kolonien aussehen, mikroskopisch jedoch die für *Prototheca* charakteristische endogene Fortpflanzungsweise besitzen, färben sich, nachdem sie zwei oder drei Wochen auf dem genannten Kulturboden gehalten, tief grün, zunächst am Rande, schliesslich jedoch auch in der Mitte.

Mit letzterer Eigenthümlichkeit wurde ich erst bekannt, als ich die unter dem Namen *Prototheca* isolierte und als ganz farblos in meine Sammlung einverleibte Form später zu meinem Erstaunen als eine *Chlorella* zurückfand.

---

[1]) In der Kral'schen Sammlung zu Prag findet diese Art sich mit meinem Namen als Artnamen, ohne dass ich weiss wer davon der Autor ist: derzeit habe ich dieselbe an mehrere Correspondenten geschickt.

[2]) Im oben erwähnten Saftflusse von der Eiche von de Grebbe fand ich, in Uebereinstimmung mit den Angaben von Ludwig für das Thüringer Material, *Saccharomyces apiculatus* und *S. ludwigii* neben sehr viel *Endomyces magnusii*, während die Hauptmasse des Schleimes sich als Essigbacterienschleim herausstellte, worin eine rundzellige, sporenerzeugende Glukosehefe die anderen genannten Pilze der Zahl nach weit übertrifft.

Die Art wurde dann in Untersuchung genommen mit den folgenden Resultaten.

Eben wie bei allen anderen Arten dieser Gattungen ist, sobald die bei der Isolierung obwaltenden Schwierigkeiten überwunden sind, kräftiges, wenn auch sehr langsames Wachstum auf die verschiedenartigsten Nährböden möglich; als besonders günstig stellten sich zuckerreiche Materialien wie Würzegelatine und ähnliche heraus und darauf entwickelen die Impfstriche sich zu ansehnlichen, etwas festen, sich seitwärts ziemlich weit ausbreitenden Massen.

Hierauf, gerade wie auf Biergelatine, ist die schliesslich erreichte Endfarbe verschieden, wie sich weiterhin ergeben wird. Das Resultat der Kultur der aus der Natur isolierten und nur einmal übergeimpften Art ist zunächst ein farbloses, schliesslich ein gleichmässig grünes Produkt.

Findet dann jedoch eine weitere Ueberimpfung statt, so tritt der variegate Charakter hervor, indem die Impfstriche, welche anfangs ganz weiss oder gelblich sind, am Rande zwar diese Farbe bleibend beibehalten, in der Mitte jedoch sich tief grün färben, und auch hier und dort einen vollständig grünen Sektor bis zum Rande hinaussenden.

Das ganze Bild ist ausserordentlich auffallend und erinnert an irgend einen Teil einer bunten Pflanze mit unregelmässiger Zeichnung, wie z. B. an die Blätter gewisser bunter Ahornvarietäten.

Das mikroskopische Bild der grünen Teile zeigt zwar sehr verschieden grosse Zellen auf, diese sind aber alle, klein und gross, ziemlich gleichmässig grün.

Der weisse oder gelbe Teil besteht aus einem Gemisch von zwei Zellenarten: farblose und gleichmässig grünliche, ohne scharf begrenzte Chromatophoren. Die Chlorophyllmenge in diesen Letzteren ist aber viel kleiner wie in den tief grünen Zellen aus der Mitte der Striche und auch verschieden in den verschiedenen gelblich grünen Zellen unter sich.

Gut ernährte Zellen enthalten viel Glykogen, welches sich besonders in den farblosen *Prototheca*-Formen so reichlich anhäuft, dass mit Iod eine tief rotbraune Farbe entsteht. Das Glycogen ist offenbar auch das Assimilations-Produkt bei der Kohlensäurezerlegung in den Chromatophoren von *Chlorella*.

Macht man Kolonienaussaaten von dem grünen mittleren Teile, so entstehen daraus, so fern dieser Teil noch jung ist, nur allein grüne Kolonien; nach längerer Aufbewahrung mischen sich in der Aussaat auch gelbliche zwischen den grünen.

Die Kolonienaussaat der weissen oder gelblichen Randpartie, auf Würze- oder Biergelatine, giebt innerhalb 3 oder 4 Wochen, der Hauptsache nach wieder weisse oder gelbliche Kolonien, jedoch vermischt mit einer sehr wechselnden Anzahl grüner. Ueberdies zeigen die gelblichen Kolonien früher oder später vollständig grüne Sektoren oder Punkte, welche so absolut ordnungslos die Kolonien durchsetzen, dass man darin die »fluktuirende«, und dennoch »sprungweise« Variabilität auf den Kulturplatten, welche keine zwei identischen Kolonien aufzeigen. im lebendigen Bilde vor sich sieht.

Gänzlich stabile *Prototheca*-Zustände wurden auf den Würze- und Bierplatten nicht erhalten.

Dieses gelang dagegen, was man vielleicht nicht erwarten würde, bei der

Kultur auf viel nahrungsärmeren Böden, wo die Ernährung wenigstens zum Teile stattfinden musste, mit Kohlensäure aus der Luft und bei Zutritt von Licht. Ich benutzte gut ausgewaschenen Agar mit Spuren Ammonnitrat und Kaliumphosphat, welcher auf die gewöhnliche Weise schief in Reagentienröhren erstarrt war. Hierauf wurden lange Striche gezogen, welche so verdünnt waren, dass nur Kolonienreihen entstanden. Sowohl aus den grünen wie aus den weissen Kolonien erwächst ein sehr eigentümliches, nur wenig verschiedenes Bild, nämlich ein buntes Gemisch von tief grünen, einigen gelblichen und vielen erblich stabilen weissen Kolonien. Auffallend ist dabei folgendes: dort, wo die keilförmige Agarschicht am dünnsten, also im oberen Teile der Röhren, bleiben alle neugebildeten Kolonien gänzlich weiss, und hier dauert das Wachstum auch kürzer wie auf den dickeren Stellen des Agars. Ganz in der Tiefe, wo die Schicht am dicksten und die Ernährungsbedingungen wohl am günstigsten, entsteht ein Gemisch von tief grünen und vollständig farblosen Kolonien. Mehr in der Mitte werden ausser diesen Beiden auch gelbliche gefunden.

Obschon der bei diesen Versuchen verwendete Agar, selbst wenn gut ausgewaschen, doch noch recht tauglich ist, findet man bald, dass die Gegenwart der geringen nicht vollständig beseitigten Menge löslicher organischen Substanzen von grossem Einfluss auf das Zustandekommen der Spaltungserscheinung ist, und ein Vergleich der mit Würze-, Bier- und armen Agarböden ausgeführten Versuche ergibt folgendes Resultat.

Eine sehr starke Ernährung mit organischen Körpern, wie Zucker und Peptonen, ermöglicht die Fortexistenz der gelblichen Form, welche aus weissen *Prototheca*-zellen besteht, untermischt mit gelblich gefärbten. So bald die Erschöpfung des Bodens beginnt, bleibt am Rande der Striche das Wachstum ziemlich unverändert, während in deren Mitte die tief grüne *Chlorella* die Ueberhand gewinnt.

Bei noch viel grösserer Erschöpfung, wie solche auf den Agarplatten mit anorganischen Salzen und Ernährung mit Luft-Kohlensäure erfolgt, entstehen viele vollständig weisse erheblich stabile *Prototheca*-Kolonien, neben der tief grünen Normalform.

Während im letzteren Falle Lichtzutritt natürlich notwendig ist für die Ernährung, kann auf den reicheren Böden auch im vollständigsten Dunkeln Wachstum und Ergrünen stattfinden. Aus vergleichenden Versuchen geht aber hervor, dass das Licht auch unter diesen Bedingungen die Chlorophyllbildung begünstigt.

Werden die vollständig farblosen Kolonien ausgesät in anorganische Nährlösungen, wie z. B. in: 100 Leitungswasser, 0,02 $K^2 H P O^4$, 0,04 $N H^4 N O^3$, so findet auch im Lichte, wie zu erwarten war, *meistens* kein Wachstum statt. Es gibt jedoch Ausnahmen, welche bei der Verwendung von gelblichen Kolonien zur Regel werden, und wobei normal grüne *Chlorella*-Kulturen entstehen, was offenbar darauf beruht, dass auch vereinzelte grüne Zellen, oder solche, welche wenigstens die Anlage zum Grünwerden noch bewahrt haben, in den weissen zur Aussaat verwendeten Kolonien vorkommen und bald die Ueberhand über alle anderen bekommen.

Die Kolonienaussaaten unserer Art auf Biergelatine zeigen, wenn dazu ältere und oft überimpfte Kulturen verwendet werden, dass die erbliche Kraft des »Buntes« in den einzelnen Keimen ausserordentlich verschieden ist, denn das Verhältnis zwischen Grün und Farblos ist in den Kolonien so verschieden wie irgend möglich.

Wenn also, wie aus dem Vorgehenden erhellt, Ernährungsbedingungen die entferntere Ursache dieser Variabilitätsform sein müssen, so ist klar, dass der Zusammenhang nur ein indirekter sein kann und dass irgend eine direkte Wirkung jener Ernährungsbedingungen auf unsichtbare Anlagen hat stattfinden müssen, mit ebenfalls zunächst unsichtbaren Resultaten.[1])

Die Frage, ob die hier beschriebene Variabilitätserscheinung wohl oder nicht übereinstimmt mit dem Verhalten der höheren bunten Pflanzen, dürfte dahin beantwortet werden müssen, dass die verschiedenen, mehr oder weniger erblich stabilen Kolonienformen, welche leicht aus *Chlorella variegata* gezüchtet werden können, gewissermassen einige der verschiedenen Variationszustände repräsentieren, welche jeder für sich bei *verschiedenen* bunten Phanerogamen vorkommen.

Theoretisch dürfte dieses erklärlich erscheinen aus dem Umstande, dass die gegenseitige Freiheit der *Chlorella*zellen, welche bei den höheren Organismen fehlt, auch freiere und morphologisch und physiologisch umfangreichere Variationsvorgänge gestattet, wie die unlösbare Verbindung zwischen den Zellen höherer Pflanzen und Tiere. Hier können im allgemeinen nur die Fortpflanzungszellen eine etwa vorhandene Anlage zur Variation auch wirklich äussern, während die somatischen Zellen eine solche Anlage nur in jenen höchst seltenen Fällen zur Schau tragen können, wenn daraus Knospen entstehen, die dann als Knospenvarianten hervortreten. Bei *Chlorella* besteht der Gegensatz zwischen Fortpflanzungs- und somatischen Zellen nicht, und jede Variation kann sofort auf den Kulturmedien beobachtet werden.

Dass tatsächlich bei *Chlorella* mehrere in erblicher Hinsicht verschiedene Buntvarianten entstehen, ergibt sich aus dem Früheren. So ist der gänzlich weisse *Prototheca* ein wie es scheint constanter, der gelbliche ein höchst variabler Variant.

Die ganz grüne Form ist bei Ernährung mit guten Kohlenstoffquellen, wie Zucker, sehr geneigt, die gelbliche Form abzuwerfen durch gewöhnliche Variation, das heisst, indem sie selbst dabei grün bleibt; doch zeigen die verschiedenen Zellen derselben Kolonie dabei grosse Verschiedenheit in Bezug auf ihre Constanz. Bei Ernährung mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle allein, scheint die Variabilität der grünen Form gänzlich zu fehlen; wenigstens gelang es nicht aus solchen in Flüssigkeiten entstandenen Kulturen, durch Kolonienaussaaten sofort weisse Kolonien zu erhalten, alle waren ausnahmslos grün.

Wenn ich nun eine Parallele ziehe zwischen diesen Verhältnissen und den bei höheren Pflanzen zu beobachtenden, so liegt ein überreiches Material vor, wovon ein paar Beispiele aus eigener Erfahrung.

In vielen Fällen ergiebt sich das Bunt bei den höheren Pflanzen als sehr unbeständig sowohl bei »Knospenselektion« wie bei »Samenauslese«, jedoch ist diese Unbeständigkeit in verschiedenen Fällen ebenso verschieden, wie die Unbeständigkeit, welche die Kolonien in einer Aussaat aus der gewöhnlichen gelblichen Varietät von *Chlorella variegata* zeigen, wovon jede von den Uebrigen verschieden ist.

In die Categorie des Bunten mit sehr geringer erblicher Kraft bei der »*Knospenauslese*«, gehört eine im Jahre 1894 aufgefundene Brennessel (*Urtica dioica*), welche

---

[1]) Zu einer ähnlichen Auffassung kommt de Vries, Mutationstheorie II vrg. 401, 1903.

einen sehr schönen bunten Zweig trug. Dieser Zweig wurde in Stücke zerschnitten, als Stecklinge im Grünhause eingepflanzt, wo diese sich leicht bewurzelten und wieder verzweigten. Diese neuen Zweige wurden wieder aufs neue abgeschnitten und gepflanzt. Allein, obgleich dafür nur diejenigen Aeste gewählt wurden, welche noch mehrere bunte Blätter trugen, konnte der Rückgang zum Grün nicht verhindert werden, und schon im Herbst 1895 war keine Spur des Bunten in den Stecklingen mehr zu sehen.

Anders verhält sich *Thymus serpyllum* var. *citriodora*. Diese in den Gärten oft kultivierte Pflanze wird in den Gärten als völlig constant »bunt« betrachtet. Dennoch gelang es, daraus innerhalb drei Jahre eine konstant grüne Varietät zu erhalten durch wiederholte Wahl für Stecklinge derjenigen Seitenzweige, welche etwas weniger »Bunt« zeigten wie die Normalform, also durch »Knospenselektion«. Der Versuch war sehr einfach und interessant. Die Pflanze ist nämlich eine hölzige Miniaturstaude, deren Stecklinge leicht Wurzel treiben. Fehler sind in umfangreichen Stecklingsbeeten, wie die meinigen es waren, schon deshalb unmöglich, weil *Thymus serpyllum citriodora* gynodiöcisch ist, und die Varietät *citriodora* nur als weibliche Form vorkommt, welche in den Gärten zwar stark blüht, aber niemals Samen erzeugt.

Die am Ende des Sommers für die weitere Auswahl bestimmten Pflanzen wurden unter Glas überwintert, weil sie für Frost etwas empfindlich sind. Das Bunt verschwindet bei diesem Verfahren sehr langsam und in kleinen Sprüngen. Wenn es scheinbar schon gänzlich beseitigt ist, bemerkt man an den älter werdenden Pflanzen hier und dort wieder einen kleinen gelben Fleck, oft nur auf einem Blatte einer ganzen Pflanze. Es ergiebt sich also, dass noch Spuren der Anlage zurückgeblieben sind. Jedoch besitze ich nun auch eine Reihe ganz grüner Exemplare, woraus auch die Anlage des Buntes gänzlich entfernt erscheint.

Ich würde nun auf Grund zahlreicher Erfahrungen eine weitere Parallele aufstellen können zwischen den sehr variabelen Kolonien von *C. variegata* einerseits und der *bei Aussaat* verschiedener bunter Pflanzen bemerkten äusserst schwachen erblichen Constanz andererseits. Obschon Beispiele davon wohl den meisten Botanikern geläufig sein dürften, da eben die grosse Veränderlichkeit des Bunten bei der Aussaat Regel ist, mag doch zur Festigung des Gedankenganges eine einzige derartige Beobachtung erwähnt werden. Seit mehreren Jahren kultiviere ich die einblättrige Honigkleevarietät *Melilotus coeruleus* var. *connata*; bisweilen in ziemlich umfangreichen Aussaaten. Dann und wann entsteht dabei ein buntes Exemplar, und da die Pflanze selbstfertil ist, kann man leicht durch Einbinden in einem Gazenetz, viele durch Inzucht erzeugte Samen davon gewinnen. Bei wiederholten Versuchen ist es jedoch nicht gelungen, daraus bei der Aussaat auch nur eine Spur von Bunt in der neuen Generation zu bemerken, und auch bei der Fortzucht aus letzterer, ergaben sich die Enkel ausnahmslos als vollständig grün. Doch wie gesagt, dürften solche Verhältnisse so allgemein bekannt sein[1]), dass es unnötig ist, dabei länger zu verweilen.

---

[1]) So behandelt de Vries, Mutationstheorie I, p. 597, 611, 1901 die Buntblätterigkeit in seinem Kapitel: »Nicht isolierbare Rassen«, welche Auffassung jedoch zu allgemein ist, weil das Bunt ebenso gut völlig fixiert sein kann, wie jede andere Eigenschaft.

Interessanter scheint es deshalb, diese Betrachtungen zu schliessen mit der Besprechung eines Falles, wo das Bunt als völlig constante Eigenschaft sowohl bei der Stecklingszucht wie bei der Aussaat auftritt. Diesen Fall erkannte ich bei *Barbarea vulgaris* var. *variegata*, welche ich in 1895 aus einer Samenhandlung in Erfurt erhielt, und ich legte mir die Frage vor, ob hierbei trotz der Constanz, dennoch Selektion möglich war.

Die erste Aussaat ergab ein sehr gleichmässiges Resultat. Es wurde ein einziges Exemplar ausgewählt, und dieses gab, durch Gaze gegen Insektenbesuch geschützt, einen guten Samenertrag, sodass die Pflanze sich als selbtfertil herausstellte.

Die starke, unserem Klima völlig angepasste Art, wird in den Beschreibungen zweijährig genannt, ist jedoch wie so viele Zweijährige, durch starkes Schneiden leicht Jahre lang zu halten. Ueberdies können Seitenzweige, als Stecklinge verwendet, sich leicht bewurzeln und neue Pflanzen liefern, sodass es sich hierbei um ein in jeder Beziehung geeignetes Versuchsmaterial handelt.

Die damit ausgeführten Versuche bezweckten, erstens durch Zweigselektion das Bunt zu erhöhen oder zu vermindern, was schon darum Erfolg versprach, weil besonders im Spätsommer eine grosse Differenz in der bunten Farbe der Zweige bemerkbar ist, und zweitens das gleiche Resultat durch Samenauslese bei strenger Inzucht zu erhalten.

Ersteres ist jedoch völlig misslungen. Selbst durchaus grün erscheinende Zweige gaben ebenso ausnahmslos wieder die bunte Hauptform, wie die wegen ihres stark ausgeprägten Bunten gewählten, sodass schliesslich der Versuch aufgegeben wurde. Wie man sieht, ist dieser Fall im völligen Contrast mit demjenigen des Citronenthymians, wo die Zweigselektion schon im dritten Jahre ein definitives Resultat gegeben hatte.

In den Saatbeeten ist eine ziemlich grosse jedoch nur scheinbare Verschiedenheit im Bunte zwischen den jungen Pflanzen bemerkbar. Bei der grossen Mehrzahl sind Samenlappen und erstes Blatt gänzlich grün, dann zeigt aber entweder das zweite, das dritte, oder erst das vierte Blatt irgend einen Buntflecken; später geht jeder Unterschied völlig verloren. Die Selektion hat nun darin bestanden, einerseits eine Familie zu züchten, wobei die am frühesten, anderseits die am spätesten bunt werdenden Exemplare ausgewählt wurden, wobei jedesmal wieder ein einzelner Samenträger verwendet und also strenge Inzucht beibehalten wurde.

Obschon sehr langsam bin ich doch auf diesem Wege sicher weiter gekommen, und zwar in beiden Richtungen der Wahl.

Ob es mir gelingen wird durch Selektion aus den Saatbeeten schliesslich eine völlig grüne Pflanze zu erhalten, ist selbst jetzt noch, nach siebenjähriger Auswahl nicht sicher, doch bin ich nun jedenfalls so weit, dass die grüne »Familie«, wovon ich drei Pflanzen bewahrt habe, deutlich verschieden ist von der ursprünglichen Form, was ebenfalls gilt in Bezug auf den Stamm, worin das Bunt accumuliert wurde. Von einem Fortschritt in Sprüngen kann ich in diesem Falle kaum sprechen; die Selektion musste so zu sagen mit fluctuirend variirenden Formen geschehen. Da ich durch einen Paralellversuch feststellen wollte, in wie weit die Inzucht hierbei vielleicht der Variabilität entgegen gewirkt hatte, wurde in einem Garten zu Gorssel ebenfalls eine Aussaat unserer Pflanze jährlich für Selektion verwendet, jedoch ohne jede Wahl eines bestimmten Samenträgers, sondern nur

durch Aussuchen der am meisten versprechenden Keimlinge aus dem umfangreichen Saatbeete, welches von den gemischten Erfurter Samen stammte.

In diesem Falle habe ich jedoch überhaupt nichts erreichen können; ich erhielt immer nur den Ausgangstypus ganz allein, so dass die Rasse sich als eine völlig constante herausstellte. Ich beabsichtigte jedoch diese ausserordentlich geeignete Versuchspflanze noch weiter zu studieren.

Wenn ich den Parallelfall aus den Kolonienaussaaten von *Chlorella variegata* aufsuche, welcher mit dem Verhalten von *Barbarea vulgaris* var. *variegata* zu vergleichen ist, so scheint es mir, dass dabei eben die Normalform in Betracht gezogen werden muss, welche frisch aus der Natur isoliert auf Biergelatine zunächst farblose Kolonien ergiebt, welche später ganz grün werden und erst durch Ueberimpfung infolge der Bildung von gelben und grünen Sektoren sich als »bunt« herausstellen.

Der Vergleich gewinnt sehr an Deutlichkeit, wenn man die ganze bunte Pflanze als eine Zellkolonie auffasst, deren Zellen den verschiedenen Zellen einer variierenden Kolonie von *Chlorella variegata* entsprechen. Wäre es möglich, *alle* Zellen einer bunten *Barbarea*pflanze zur Vermehrung zu bringen und daraus neue Pflanzen zu züchten, so ist es wahrscheinlich, dass dabei ziemlich verschieden aussehende, also mehr oder weniger bunte Pflanzen würden erhalten werden, welche den weniger stabilen Ueberimpfungen von *Chlorella* zu vergleichen wären, die jedoch, wenn es zur Ausbildung von Geschlechtszellen käme, wohl ohne jeden Zweifel nur solche erzeugen könnten, welche wieder den Typus in völlig normaler Ausbildung hervorbringen würden.

Das Assimilationsprodukt der Kohlensäure in den Chromatophoren der Diatomeen.

Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais, Nijmegen, Vol. I, 1904, p. 28—32.

Da ich in der mir zur Verfügung stehenden Literatur keine bestimmte Antwort auf die hier gestellte, für die Planktologie hochwichtige Frage gefunden habe, und ebensowenig auf die weitere, damit zusammenhängende Frage nach der Natur der in der Diatomeenzelle gespeicherten Reservenahrung, erscheint die Mitteilung meiner eigenen Erfahrungen in dieser Beziehung nicht überflüssig. Warum die weitschichtige Diatomeenliteratur eben über diese Punkte so wenig klare Angaben enthält, folgt aus dem Umstande, dass die zahlreichen Diatomeenforscher wohl viel mikroskopiert aber nur wenig kultiviert haben.

Dennoch ist die Kultur von mehreren, zu den Gattungen *Nitzchia*, *Navicula* und *Cocconema* gehörigen Arten sehr einfach; nur ist es notwendig, dieselben durch das Plattenverfahren von den Grünalgen und ähnlichen Organismen zu trennen und das ist eben die Schwierigkeit, welche die Mikroskopiker nicht überwinden konnten.

Die Hauptbedingung für die Reinkultur der Diatomeen, der Cyanophyceen und vieler niederen Grünalgen ist einfach diese: im Nährboden dürfen nur Spuren von löslichen organischen Körpern vorkommen, während die mineralischen Nährsalze ebenfalls nur in sehr verdünntem Zustand vorhanden sein müssen.[1]) Bei den Cyanophyceen kommt, wie ich früher gezeigt habe, noch der begünstigende Einfluss der Abwesenheit von Stickstoffverbindungen, weil diese Organismen den freien Stickstoff zu assimilieren vermögen. Die Diatomeen besitzen dieses Vermögen zwar nicht, doch entwickeln sie sich am besten, wenn auch in ihrem Nährboden die Stickstoffverbindungen nur sehr verdünnt vorkommen, so dass für deren Reinkultur der nämliche Boden wie für die Cyanophyceen gut geeignet ist.[2]) Als solche erkannte ich mit strömendem Wasser ausgewaschene Kiesel- oder Agarplatten. Für die Anfertigung von Kieselplatten verfährt man folgendermassen:

Die concentrierte Wasserglaslösung des Handels wird mit Wasser verdünnt und genau mit Salzsäure titriert. Es wird dann durch Ausprobieren festgestellt,

[1]) Die ersten Reinkulturen von Diatomeen erhielt ich im Jahre 1895 bei der Isolierung der Nitritfermente auf gewaschener, Kreide und Chlorammon-haltigem Agar. Vor Kurzem hat auch Richter, Ber. d. d. Botan. Gesellschaft Bd. 21, pag. 493, 1903, über die Reinkultur von Diatomeen geschrieben.

[2]) Oligonitrophilie bij Cyanophyceen. Centrbl. f. Bacteriologie. 2t Abt. Bd. 7, p. 562, 1901.

mit wie viel Wasser verdünnt werden muss, um, gerade bevor die Erstarrung erfolgt, die Salzsäure gut mit der verdünnten Lösung vermischen und in eine Glasdose, worin die Erstarrung zu einer Platte stattfindet, ruhig ausgiessen zu können. Es wird dann im Wasserstrom ausgewaschen, durch Aufgiessen einer Salzlösung, z. B. von $^1/_{20}$ % $K^2 H P O^4$ und $^1/_{20}$ % $NH^4 Cl$, die nötige Nährsalzquantität hineingebracht,[1]) das Uebermass der Salzlösung abgegossen, das anhängende Wasser durch schwache Erwärmung abgedunstet und vorsichtig flambiert, wobei man leicht einen sterilen, ca. 3 % Kieselsäure haltigen Boden, mit schön glänzender Oberfläche erhält. Hierauf wachsen sowohl Grünalgen wie Diatomeen sehr üppig und bei Fortlassung des Ammonsalzes auch die Cyanophyceen.

Ein ebenso gutes Resultat gibt die Kultur auf scharf ausgelaugtem Agar, welcher übrigens auf die gleiche Weise behandelt wird. Sowohl der Wasserglaslösung wie dem Agar kann zuvor Kreide zugesetzt werden, was z. B. bei Versuchen mit den Nitritfermenten notwendig ist.

Um Diatomeenkolonien auf diesen festen Böden zu erhalten, kann man sowohl Gartenerde wie Grabenschlamm darauf zur Aussaat bringen. Dass die Gartenerde sehr reich an Diatomeen ist, habe ich bei einer früheren Gelegenheit schon nachgewiesen.

Die Ursache warum ich eben nun in diesem Zusammenhang die Einzelheiten der Kultur bespreche, ist, dass ich die gleichen Diatomeenarten dabei unter sehr verschiedenen Ernährungsbedingungen kennen lernte und gerade dadurch Sicherheit erlangte in Bezug auf das Kohlensäure-Assimilationsprodukt derselben.

Es handelt sich hierbei nämlich um *fettes Oel*, und es ist bekanntlich sehr leicht, diesen Körper vermittelst der Osmiumsäurereaction nachzuweisen sobald es in freien Tropfen in den Zellen liegt, viel schwieriger dagegen während es noch im Protoplasma, hier also in den Chromatophoren eingeschlossen oder besser gesagt, gelöst ist, doch gelingt auch dieses, wenn man die Farbetönungen beleuchteter und verdunkelter, mit Osmium behandelter Chromatophoren nur mit der nötigen Vorsicht vergleicht.

Glycogen, Stärke und Paramylum fehlen bei allen von mir untersuchten Diatomeen, centrischen sowohl wie penaten, vollständig; selbst dort wo in den Chromatophoren ein Pyrenoid erkennbar zu sein scheint, konnten keine deutlichen mit diesen Stoffen angefüllten Amylumheerde erkannt werden.[2])

Die Kulturbedingungen lehrten folgendes: so lange die Diatomeen kräftig genug wachsen, um das gebildete Oel zu assimilieren, und in protoplasmatische und andere Körpersubstanzen zu verwandeln, bemerkt man keine Anhäufung desselben und die Chromatophoren enthalten davon nur Spuren. Jede Ursache aber welche das Wachstum beeinträchtigt, bei übriger ungestörter Kohlensäureassimilation, gibt zu einer kräftigen und leicht sichtbaren Anhäufung von Oeltropfen Veranlassung, welche zuerst in den Chromatophoren selbst, dann auf deren Ober-

[1]) Und mit 3 % Cl Na versetzt, wenn es sich um die Kultur von Meeresdiatomeen handelt.

[2]) Schütt, Bacillariaceen in Natürl. Pflanzen-familien. Thl. I, Abt. 1b, pag. 47. 1896 sagt dagegen: »Die Chromatophoren mancher Arten besitzen eine oder mehrere Pyrenoide mit oder ohne Amylumheerde.« Welche Arten hier gemeint sind, weiss ich nicht.

fläche sichtbar werden, und später die Zellhöhlung ausfüllen, wobei es bis zur vollständigen Verdrängung der gesammten Vacuolenflüssigkeit gehen kann.

Wie müssen nun aber die Kulturbedingungen beschaffen sein, damit das Wachstum gehemmt wird ohne Schädigung der Kohlensäure-Assimilation?

Dieses ist auf sehr verschiedene Wege zu erreichen, wovon ich hier nur einen besprechen will, welcher auf der Tatsache beruht, dass das Kohlensäureassimilationsprodukt der Diatomeen eben identisch ist mit der durch diese Organismen gespeicherten Reservenahrung.[1])

Sobald bei übrigens günstigen Lebens- und Wachstumsbedingungen irgend ein für das Wachstum notwendiges Element fehlt, wird dieser Vorgang etwas herabgesetzt, ohne dass die Funktionen der Einzelzelle dabei beeinträchtigt zu werden brauchen. Dieses Prinzip gibt ein besonders übersichtliches Resultat, wenn das fehlende Element der gebundene Stickstoff ist, und so kommt man zu folgendem Versuche: Ein guter, nach obiger Vorschrift angefertigter *fester Kulturboden* wird einerseits mit ein wenig z. B. $^1/_{50}$ % Cl NH^4 versehen und andererseits ohne gebundenem Stickstoff verwendet. Zur Aussaat auf beiden Böden verwendet man am besten eine schon früher hergestellte Diatomeenkultur, doch kann auch Diatomeen-haltige Gartenerde oder Grabenschlamm ohne weiteres verwendet werden.

Nach ein oder zwei Wochen ist das Resultat ganz unzweifelhaft. Die Kultur auf dem Chlorammon-haltigen Boden ist stark gewachsen und hält kein deutlich bemerkbares Oel; dagegen hat die Kultur auf dem Stickstoff-armen Boden mehr oder weniger massenhaft Fett gespeichert.

Auch mit Kulturflüssigkeiten kann mit gleichem Erfolge experimentiert werden. doch muss man dabei den Luftzutritt genau überwachen, um ein wirklich überzeugendes Resultat zu bekommen, was am besten geschieht durch Kultur in sehr dünner Schicht der Nährlösung.

Da ich die gleichen Ergebnisse mit verschiedenen Diatomeenarten der oben genannten Gattungen des Süsswassers und des Meeres erhalten habe, ist an die allgemeine Gültigkeit des Satzes, dass fettes Oel das erste sichtbare Assimilationsprodukt der Kohlensäure in den Diatomeenzellen ist, nicht zu zweifeln.

Ich gehe jedoch noch einen Schritt weiter, denn mikroskopische Erfahrungen haben mich gelehrt, dass auch die übrigen von mir untersuchten Phycochromhaltigen Planktonorganismen, nämlich gewisse Peridineen und Chrysomonadineen z. B. *Phaeocystis pouchetii*, ebenfalls in ihren Chromatophoren fettes Oel erzeugen, während Stärke und Glycogen darin fehlen. Vielleicht ist die Regel auch auf viele höhere Braunalgen anwendbar, wovon ich jedoch nur wenig Erfahrung habe.

Jedenfalls dürfte die Tatsache, dass die Diatomeen Oelbilder sind, Licht werfen auf ihre allgemeine und grosse Bedeutung für das Plankton, indem das Oel wohl als eine sehr zweckentsprechende Schwebeinrichtung betrachtet werden muss.

---

[1]) Es ist notwendig, Letzteres scharf zu betonen, weil es eine ziemlich allgemeine Regel, ich möchte beinahe sagen ein Naturgesetz ist, dass bei übrigens günstigen Wachstumsbedingungen die Zellen von allerlei Tieren, Pflanzen und Mikroben, bei Mangel an assimilierbarem Stickstoff fettes Oel erzeugen, soweit diese Zellen überhaupt zur Fettbildung geeignet sind.

Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, XI. Band, 1904, S. 592—599.

Bekanntlich hat Herr Winogradsky angegeben[1]), daß die von ihm entdeckten Mikroben der Nitrifikation die Energie, welche dieselben durch die Oxydation der Nitrite in Freiheit setzen, verwenden für die Zerlegung der Kohlensäure, und daß dieselben aus letzterem Körper als Kohlenstoffquelle ihre organische Leibessubstanz aufbauen sollten. Indessen habe ich mich von der Richtigkeit dieser Ansicht nicht überzeugen können, stieß dagegen bei der Nachprüfung seiner Angaben auf einen, eben für die in Nitratbildung begriffenen Kulturflüssigkeiten charakteristischen Mikroben (Bacillus oligocarbophilus), welcher sich mit den organischen Kohlenstoffverbindungen der Laboratoriumsluft ernährt[2]).

Die Anhäufung von organischem Stoff, welchen man bei der Nitrifikation dann und wann auch nach meiner Erfahrung beobachtet, muß deshalb auf diesen Mikroben, dessen Atmung auf die gewöhnliche Weise Energie erzeugt, zurückgeführt werden. Auch bemerkte ich in meinem Grünhause, wo die Luft viel reiner ist als im Laboratorium, bei gleich starker Nitrifikation gar kein oder erst viel späteres Wachstum von B. oligocarbophilus, welcher von Anfang an den Kulturen zugesetzt war.

Im vorigen Jahre ist Herr Natanssohn[3]) auf die Frage zurückgekommen, und hat gezeigt, daß im Meere Bakterien vorkommen, welche durch Oxydation von Schwefelwasserstoff oder von Thiosulfat ($Na^2S^2O^3$) imstande sind, Kohlensäure zu reduzieren und daraus ihre organische Körpersubtanz aufzubauen.

Ich kann die Richtigkeit seiner Versuche durchaus bestätigen und durch eigene Erfahrungen ausdehnen.

Zunächst war es mir bekannt, daß die Erscheinung sich noch leichter nachweisen läßt für Süßwasserformen als für diejenigen des Meeres, welche letztere jedoch auch an der holländischen Küste ganz allgemein sind. Weiter ist mir der Prozeß noch unter einer ganz anderen Form vorgekommen, nämlich als Denitri-

[1]) Annal. de l'Institut Pasteur. T. VI. 1891. p. 270 und 462.

[2]) Centralbl. f. Bakteriol. Abt. II. Bd. X. 1903. p. 33.

[3]) Ueber eine neue Gruppe von Schwefelbakterien. (Mitt. der zool. Station zu Neapel. B. XV. 1903. Heft 4. p. 655.)

fikationsvorgang mit freiem Schwefel als Energiequelle. Schließlich erkannte ich die gleiche Erscheinung bei der Spaltung der Rhodanate durch Bakterien, besonders beim Ammoniumrhodanat ($CNS.NH^4$), welches ebenfalls mit Bildung freien Schwefels stattfindet.

Meine Beobachtungen habe ich zum ersten Male vorgetragen am 16. April 1903 auf der 9. Versammlung der niederländischen Naturforscher und Ärzte zu Delft[1])

Ich will zunächst meine Versuche beschreiben, welche denjenigen von Herrn Natanssohn ganz parallel sind.

1. Die Reduktion der Kohlensäure mit Schwefelwasserstoff, Thiosulfat oder Tetrathionat als Energiequelle.

Man fülle einen gewöhnlichen oder einen Erlenmeyer-Kolben mit einer nicht zu dicken Schicht der folgenden Nährlösung, welche keine andere Kohlenstoffquelle wie Natriumbikarbonat und als Energiequelle Natriumthiosulfat, $Na^2S^2O^3$, enthält:

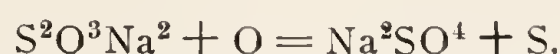
H^2O	100
$Na^2S^2O^35H^2O$	0,5
$NaHCO^3$	0,1
K^2HPO^4	0,02
NH^4Cl	0,01
$MgCl^2$	0,01

Kochen oder Sterilisieren ist überflüssig[2]).

Es wird infiziert mit einer reichlichen Quantität Graben- oder Kanalwasser oder mit einer Spur Grabenschlamm[3]), und es wird kultiviert im Thermostaten bei 28° C bis 30° C. Ob im Licht oder Dunkeln ist gleichgültig. Nach 2 oder 3 Tagen bedeckt sich die Oberfläche der Kulturflüssigkeit mit einer Schicht freien Schwefels, welche dicht mit Bakterien erfüllt ist.

Man impft eine Spur dieser Haut über in eine ganz ähnliche Lösung, wobei also jede Verunreinigung mit organischen Stoffen aus dem Wasser oder dem Schlamm ausgeschlossen ist, und sieht dann sicher nach 24 Stunden eine noch kräftigere Hautbildung wie bei der Rohimpfung.

Eben wie beim Versuche von Herrn Natanssohn findet hierbei die folgende Spaltung statt.



$$S^2O^3Na^2 + O = Na^2SO^4 + S,$$

welcher Prozeß exothermisch ist und also als Energiequelle fungieren kann. Daß diese Energie tatsächlich für die Kohlensäurereduktion des Natriumbikarbonates, d. h. also für die Bildung der organisehen Stoffe der Bakterienkörper, verwendet wird, ist unzweifelhaft. Diese wichtige Tatsache ergibt sich daraus,

---

[1]) Phénomènes de réduction produits par les microbes. (Archives Néerlandaises. Sér. II. T. IX. 1904. pag. 131.)

[2]) Oder schädlich, insoweit das Bikarbonat sich spalten kann.

[3]) Der Grabenschlamm in Holland, sowie der Meeresschlamm an unserer Küste enthält überall FeS oder H^2S, entstanden durch Sulfatreduktion durch Microspira desulfuricans im Süßwasser, durch M. aestuarii im Meere.

daß der Versuch desto besser gelingt, je sorgfältiger man organische Kohlenstoffquellen fernhält. [1])

In diesem Versuche läßt sich das Thiosulfat durch Schwefelwasserstoff oder besser durch CaS ersetzen, wovon wegen der stark alkalischen Bakterien nicht mehr wie ca. 0,1 Proz. zu verwenden ist, und wobei nach Abspaltung von H^2S durch Kohlensäure der Oxydationsvorgang nach der Formel

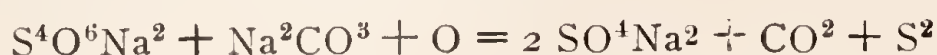


$$H^2S + O = H^2O + S$$

stattfindet.

Weil H^2S jedoch schon an der Luft oxydiert, ist letztere Reaktion weniger elegant, in der Natur jedoch sicher viel wichtiger und allgemeiner, wie die erstere, weil das Thiosulfat in den Gewässern viel seltener ist.

Etwas schwieriger, jedoch auch sehr schön und überzeugend, gelingt der Versuch mit Tetrathionat, nach der Formel



$$S^4O^6Na^2 + Na^2CO^3 + O = 2\ SO^4Na^2 + CO^2 + S^2$$

wobei, wie man sieht, eine Zugabe von Natriumkarbonat äquivalent dem verwendeten Tetrathionat notwendig ist, um die in diesem Falle gebildete freie Schwefelsäure zu binden [2]).

Das Dithionat, $Na^2S^2O^6$, wird durch unsere Bakterien nicht gespalten. Das Ammonsalz als Stickstoffquelle kann durch Nitrat ersetzt werden. Andere Kohlenstoffverbindungèn, wie Kohlensäure, um das Kohlenstoffbedürfnis zu befriedigen, konnten nicht aufgefunden werden. Sicher untauglich dafür sind Ureum, Formiate, Oxalate sowie die komplizierteren organischen Stoffe.

Bei allen diesen Versuchen kann das 0,1 Proz. Natriumbikarbonat durch 0,05 Proz. Na^2CO^3 ersetzt werden, jedoch ist dann das Resultat weniger sicher. Offenbar ist die leichte Abspaltung der freien Kohlensäure dem Stoffwechsel unserer Bakterie günstig.

Es ist wichtig, die genannten Mengenverhältnisse genau zu beachten, besonders ein zuviel an Karbonat ist schädlich. Auch bei 2 Proz. $Na^2S^2O^3$ steht alles schon still, und es findet dann überhaupt keine Schwefelabscheidung statt. Bei ca. 1,5 Proz. $Na^2S^2O^3$ liegt die Grenze der Konzentration, welche die Spaltung noch ermöglicht und ebenfalls die Thiosulfatmenge, welche mit 0,01 Proz. Natriumbikarbonat äquivaliert. Es könnte also 0,1 g Natriumbikarbonat (oder 0,5 g Na^2CO^3) das plastische Aequivalent zu 0,5 g Thiosulfat genannt werden.

Bei dem Versuche mit 0,5 Proz. $Na^2S^2O^3$ ist nach 4 oder 5 Tagen die Spaltung vollständig beendet. Wünscht man die Bakterien dann abzusondern und vom Schwefel zu trennen, was nicht ganz leicht ist, so muß man wie folgt verfahren:

Man saugt mit einer Pipette die unterhalb der Haut befindliche Flüssigkeit ab, wobei allerdings schon viele Bakterien verloren gehen; weil die Flüssigkeit jedoch kaum trübe ist, ist dieser Verlust relativ gering. Die aus Schwefel und Bakterien bestehende Haut wird nun mit soviel Benzol geschüttelt, bis aller Schwefel

[1]) Ganz anders also, wie im früher beschriebenen Falle der Nitrifikation, wobei Bacillus oligocarbophilus sich mit den organischen Verbindungen, welche in der atmosphärischen Luft vorkommen, ernährt.

[2]) In den Betrachtungen, welche Herr Natanssohn an die Wirkung des Thetrathionats knüpft, kann ich ihm nicht folgen; dieselben sind unrichtig.

gelöst ist. Hierbei entsteht eine trübe Emulsion, weil das Wasser, welches den Bakterien anhängt, sich nicht abscheidet, sondern als kleine Tröpfchen im Benzol suspendiert verbleibt, und finden in diesen Tröpfchen gerade sich alle Bakterien vor. Läßt man die Emulsion einige Zeit stehen, so sinkt das bakterienhaltige Wasser nach unten, wodurch es möglich wird, den größten Teil des Bensols und also des darin gelösten Schwefels zu entfernen.

Das noch wenig Schwefel und viel Benzol enthaltende Wasser wird nun mit einem Uebermaß Alkohol von 96 Proz. versetzt, welcher sowohl das Benzol wie den Schwefel löst, die Bakterien dagegen quantitativ präzipitiert.

Allerdings ist die so erhaltene Menge an organischer Bakteriensubstanz gering, jedoch vermittelst Permanganat leicht nachweisbar und die Entstehung derselben aus Kohlensäure vollständig gesichert.

Die Reinkultur sowohl der Süßwasser- wie der an den niederländischen Küsten ganz allgemeinen Meeresform gelang auf ähnliche Weise, wie schon von Natanssohn angegeben worden ist. Für die Süßwasserform wurde die oben angegebene Kulturflüssigkeit mit 2 Proz. Agar erstarrt und auf der Platte Material von der schwefelhaltigen Haut abgestrichen. Die Schwefelbakterie wird dann nach ein paar Tagen kenntlich durch die starke Schwefelabscheidung auf den Kolonieen, welche bei den Verunreinigungen fehlt. Für die Isolierung der Meeresform muß dem Agar noch 3 Proz. Kochsalz zugesetzt werden.

Hat man für die Kultur Nitrat anstatt Ammonsalz als Stickstoffquelle verwendet, so findet man unter den verunreinigenden Formen eine mit B. Stutzerei verwandte Bakterie, welche offenbar eine denitrifizierende Wirkung ausübt, wobei die abgestorbenen Schwefelbakterien den organischen Stoff als Energiequelle für die Denitrifikation darbieten.

Die Bakterie selbst ist ein kleines und dünnes Kurzstäbchen von 3 bei 0,5 μ, welches keine Sporen erzeugt und sehr beweglich ist.

Die Respirationslinie bildet sich nach dem Spirillentypus, d. h. die Bakterien sammeln sich durch ihre Bewegung in einiger Entfernung vom Meniskus an.

Bei der Aufbewahrung ergibt sich die Art als sehr empfindlich; schon nach einer Woche oder selbst noch früher erweisen sich die Kolonieen auf der Agarplatte als abgestorben.

Ich schlage vor, die Süßwasserform Thiobacillus thioparus zu nennen.

Ich gehe nun zur Besprechung eines ganz anderen Weges über, der zu farblosen Bakterien führt, welche im Dunklen Kohlensäure zersetzen und zu ihrer organischen Nahrung verwenden können. Es handelt sich um Denitrifikation vermittelst des freien Schwefels.

2. Die Reduktion der Kohlensäure durch Denitrifikation mit freiem Schwefel als Energiequelle.

Die hier in Betracht kommende Bakterienart ist von der vorigen verschieden, und wird infolgedessen als Thiobacillus denitrificans bezeichnet werden. Sie wird durch folgenden Versuch erhalten, wobei als Energiequelle, welche zur Kohlensäurezerlegung Veranlassung gibt, gediegener Schwefel fungiert, welcher durch Denitrifikation in Sulfat verwandelt wird.

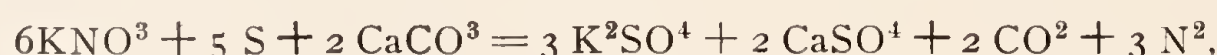
Zur Ausführung des Versuches wird, wie folgt, verfahren: Eine gut geschlossene Flasche ist gänzlich angefüllt mit:

Grabenwasser	100
Schwefel als Pulver	10
KNO^3	0,05
Na^2CO^3	0,02
$CaCO^3$	2
K^2HPO^4	0,02

und es wird bei 30° C kultiviert. Außer denitrifizierenden Bakterien, welche auf Kosten der organischen Substanz des unreinen Wassers leben, enthält das Wasser auch T. denitrificans in genügender Menge, um auch den Denitrifikationsprozeß mit Schwefel als Grundlage einzuleiten, so daß nach 5 bis 6 Tagen ein regelmäßiger Stickstoffstrom sich zu entwickeln beginnt. Man impft nun in die gleiche Flüssigkeit über, worin jedoch das unreine Wasser durch destilliertes Wasser ersetzt ist. Also in

H^2O	100
Schwefel	10
KNO^3	00,5
Na^2CO^3	0,02
$CaCO^3$	2
K^2HPO^4	0,02
$MgCl^2$	0,01.

Darin wird innerhalb einer Woche der gleiche Vorgang, jedoch in beträchtlich stärkerer Intensität bemerkbar. Dieser verläuft der Hauptsache nach nach der Formel



$$6KNO^3 + 5\ S + 2\ CaCO^3 = 3\ K^2SO^4 + 2\ CaSO^4 + 2\ CO^2 + 3\ N^2,$$

welcher Vorgang exothermisch ist und 659,5 Kalorieen entwickelt, also ca. 1 Kal. pro Gramm zerlegten KNO^3.

In einer Flasche von 210 cm^3 wurden 900 mg KNO^3 in 12 Tagen zum Verschwinden gebracht, wobei der Salpeter je in Dosen von 100—200 mg zugesetzt wurde, wenn es sich zeigte, daß die vorher zugesetzte Menge verschwunden war.

Die Schwefelmenge, welche dem verschwundenen Nitrat entspricht, beträgt nach obiger Formel, wenn als $BaSO^4$ gewogen, 0,4325 g. Faktisch wurden jedoch nur 0,283 g $BaSO^4$ gefunden, so daß ungefähr die Hälfte des Salpeters auf andere Weise zerlegt sein muß, wahrscheinlich durch einen Denitrifikationsprozeß auf Kosten von organischer Substanz von Bakterienleichnamen stammend, welche ihrerseits also wieder auf die Reduktion der Kohlensäure zurückzuführen ist.

Die in den Flaschen oberhalb des sedimentierten Schwefels und der Kreide stehende Flüssigkeit ist anfangs natürlich wasserklar. Beim Fortschreiten der Reaktion trübt sie sich jedoch sehr beträchtlich, und zwar nicht allein durch T. denitrificans, sondern auch durch einige andere Bakterien, worunter T. thioparus, welcher an und für sich nicht denitrifiziert, in auffallend großer Menge, wie sich aus den Plattenkulturen ergibt, sowie ein sehr feines und eigen-

tümliches Spirillum, welches nicht isoliert werden konnte, und ferner einen Vibrio (Vibrio devorans n. sp.) und das früher auch schon genannte denitrifizierende, mit B. Stutzeri verwandte Stäbchen.

Die Gegenwart von T. thioparus zeigt, daß die Flüssigkeit außer dem Schwefel und Sulfat, auch noch andere Schwefelverbindungen enthalten muß. Es ist denn auch vermittelst einer Spur eines Ferrosalzes leicht nachzuweisen, daß dazu H^2S gehört, sobald das KNO^3 verschwunden ist. Doch verschwindet dieser H^2S wieder bald, wenn aufs neue Salpeter zugesetzt wird, so daß auch H^2S zu einem Denitrifikationsprozeß oder wenigstens zu Nitratreduktion veranlassen kann. Die große Leichtigkeit, womit Schwefelwasserstoff entsteht, wenn die verschiedenartigsten (jedoch durchaus nicht alle) lebenden Bakterien (sowie die aktiven Alkoholhefen) mit Schwefel in Berührung kommen bei Gegenwart von organischer Substanz, hier also mit toter Bakterienleibessubstanz, erklärt die Gegenwart des H^2S zur Genüge.

Gerade die große Leichtigkeit, womit man sowohl diesen letzteren Vorgang, wie die früher besprochene Denitrifikation, welche auf der Gegenwart von aus Kohlensäure gebildeter organischer Substanz beruht, in den älteren Kulturen beobachtet, zeigt deutlich, daß der Schwefel in mehrfacher Beziehung eine wichtige Rolle im Kreislaufe der Natur zu erfüllen hat, denn es ist klar, daß dieses Element in seinen verschiedenen Verbindungsformen in den dunklen Tiefen des Meeres und der süßen Gewässer immerfort tätig ist bei der Neuschaffung von organischer Substanz.

Die Reinkultur von T. denitrificans ist schwieriger, wie diejenige von T. thioparus, gelingt übrigens auf demselben Kulturboden, also auf

Leitungswasser	100
$Na^2S^2O^3 . 5H^2O$	0,5
K^2HPO^4	0,01
$NaHCO^3$	0,02
Agar	2.

Weil hierbei von T. denitrificans ebenfalls Schwefel abgetrennt wird, wenn auch in sehr geringer Menge, muß auch diese Art im stande sein, das Thiosulfat nach der früher gegebenen Formel zu oxydieren. Uebrigens sind die Kolonieen gänzlich verschieden von denjenigen von T. thioparus, indem erstere als große dünne, beinahe glashelle, sehwierig sichtbare, mit Schwefeltröpfchen durchsetzten Anflüge die Agarplatten bedecken, während S. thioparus darauf kleine runde, wie trockener, gelber Staub aussehende Kolonieen erzeugt.

Auch T. denitrificans ist ein Kurzstäbchen, welches sehr beweglich ist und mikroskopisch sich kaum von T. thioparus unterscheidet. Wie bei letzterem sind die Kolonieen empfindlich und sterben schon wenige Tage nach der Isolierung vollständig ab. Auch verlieren dieselben, selbst bei frühzeitiger Ueberimpfung auf neue Platten gänzlich das Vermögen, weiter zu wachsen, d. h. sie verlieren ihre Vegetationskraft, schon längst, ehe sie abgestorben sind.

Während es nicht gelang, T. thioparus auf Fleischbouillongelatine zu kultivieren, ist es möglich, T. denitrificans darauf zur Entwickelung zu bringen. Es ist aber dazu notwendig, die gewöhnliche Bouillongelatine mit zweimal dem

Volum H^2O-Gelatine zu versetzen. Fügt man dann noch überdies 0,25 $Na^2S^2O^3$ hinzu, so geben die Striche, von reinkultiviertem T. denitrificans stammend, kleine, viel Schwefel erzeugende Kolonieen, welche denjenigen von T. thioparus auf den »anorganischen« Agarplatten ganz ähnlich sind.

Die Zersetzung der Rhodanate findet unter profuser Absonderung von freiem Schwefel unter ähnlichen Bedingungen statt, wie die vorgehend beschriebenen Prozesse, z. B. in der zuerst genannten Kulturflüssigkeit, wenn man darin das Thiosulfat durch 1/4 Proz. Ammonrhodanat ($CNS.NH^4$) ersetzt, wobei ein eigentümlicher Biochemismus obwaltet, auf den ich später zurückzukommen hoffe.

L'influence des microbes sur la fertilité du sol et la croissance des végétaux supérieurs.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Série II, Tome IX, 1904, p. VIII—XXXVI. — Verscheen onder den titel »De invloed der mikroben op de vruchtbaarheid van den grond en op den groei der hoogere planten« in het Landbouwkundig Tijdschrift, Groningen 1904, blz. 225—250; en verscheen onder denzelfden titel bij J. B. Wolters te Groningen.

Dans la première partie de son traité de chimie de la terre arable, paru en 1860, G. J. Mulder a dit: »En divers endroits dans la terre de culture s'opèrent continuellement deux phénomènes contraires d'oxydation et de réduction; l'oxydation a lieu là où l'air a librement accès, la réduction là où l'air ne peut plus agir en toute liberté, c. à d. dans les couches relativement profondes, ou bien dans un terrain compact ou dans un sol trop humide.«

Dans ces quelques mots Mulder a exposé les deux processus les plus importants qui donnent à la terre sa fertilité. Le phénomène d'oxydation, par lequel les substances organiques disparaissent, est généralement avantageux, tandis que la réduction, ou toute autre décomposition qui l'accompagne, n'est pas désirable d'ordinaire, parce qu'elle peut entraîner une accumulation indéfinie de matière organique.

Dans l'état où se trouvait la science en 1860, on ne se doutait pas encore du rôle prépondérant que jouent les microbes dans les actions qui s'opèrent dans le sol; mais précisément à cette époque les découvertes de Pasteur, relatives aux organismes des fermentations, commencèrent à être bien établies sur une base scientifique par la réfutation du dogme de la génération spontanée, remplacé par la théroie de la biogenèse, qui revient en principe à ceci: que toute cellule vivante résulte d'une autre cellule. Mainte transformation s'opérant dans le sol ou à sa surface, qui autrefois ne semblait explicable que par des actions chimiques, fut reconnue comme une conséquence des phénomènes vitaux de microbes spécifiques, se multipliant d'une façon indépendante. La nouvelle explication n'a rien changé aux faits: la destruction de la matière organique est restée un processus d'oxydation, mais on sait à présent que cette oxydation est produite en majeure partie par la respiration des microbes vivant dans le sol et qui, tout comme les organismes supérieurs, absorbent de l'oxygène pour céder de l'anhydride carbonique à leur entourage; comme véritables agents de ces transformations, ces microbes sont donc devenus l'objet principal de toutes les considérations relatives à ce sujet, et le labeur agricole, le travail rationnel du sol arable, peut être défini comme la méthode de conserver l'équilibre entre les actions microbiologiques, nécessaires au développement des plantes supérieures.

C'est sur un pareil équilibre entre les oxydations et les réductions produites par les microbes qu'est basée la formation de l'humus fertile des champs et des bois. Si l'oxydation prédomine trop, cet humus peut disparaître. Mais quand la réduction l'emporte, la matière organique s'accumule et le sol perd sa fertilité par la formation de tourbe. Quand l'oxydation est activée dans une tourbière, les microbes peuvent généralement réparer le mal et, diminuant l'excès de substance organique, refaire un humus fertile.

Mais le dégât causé par la réduction n'est pas toujours réparable par une oxydation ultérieure, surtout quand cette oxydation est de nature chimique et que les bactéries sont impuissantes. Nous en trouvons un bon exemple dans les terres acides si redoutées, formées par alluvionnement ou par endiguement dans les terrains argileux voisins de la mer, et dont l'origine et la composition ont été expliquées par les belles recherches de M. le Prof. van Bemmelen sur l'alluvium hollandais. La stérilité de ces terres provient de l'oxydation, par l'oxygène de l'air, de pyrite et de soufre à l'état de sulfate ferrique et d'acide sulfurique vénéneux, tandis que la pyrite et le soufre eux-mêmes avaient pris naissance, dans une phase antérieure, le sol étant encore baigné d'une eau saumâtre, par la réduction de sulfates à l'état d'hydrogène sulfuré, sous l'action de microbes, en présence d'oxyde de fer.

Le carbone de toute substance organique est originaire de l'acide carbonique de l'atmosphère, qui n'en contient qu'environ 3½ dix-millièmes. Si le carbone de cet acide pouvait être isolé et recouvrait la surface terrestre d'une couche uniforme, l'épaisseur de la pellicule ainsi formée n'atteindrait pas encore un demi millimètre. Cette minime quantité est pourtant la seule source de carbone pour la construction du corps de tous les êtres vivants; la lumière fournit l'énergie, et cette énergie est emmagasinée par la réduction de l'acide carbonique, avec élimination d'oxygène, dans la chlorophylle des plantes supérieures et inférieures. Ce chimisme commence par la formation de sucre, d'amidon ou de graisses qui, sous l'action des forces vitales, forment de nouvelles combinaisons avec les nitrates ou les sels ammoniacaux, les phosphates et les sulfates, tous présents dans le sol et fournissant l'azote, le phosphore et le soufre, indispensables pour la vie; le potassium, le magnésium, le calcium, le fer et le manganèse, tout aussi nécessaires bien qu'en faibles quantités, sont également enlevés au sol.

A cette fixation d'acide carbonique, processus formateur de tout ce qu'il y a d'organique, est opposée la destruction, la régénération de l'acide carbonique aux dépens de la matière organisée, par la respiration des êtres vivants en général, des microbes en particulier. Par la respiration des microbes, qui s'opère partout à la surface du sol, ce n'est pas seulement le carbone qui est remis en liberté sous forme d'acide carbonique, moyennant une consommation d'oxygène, mais l'azote, le phosphore, le soufre, le potassium, le magnésium, le fer et le manganèse retournent aussi à l'état minéral. Ce n'est que dans ces dernières années que l'on a compris et apprécié à sa juste valeur la signification de ce grand phénomène naturel, la »minéralisation« des substances organiques, qui donne lieu à ce que l'on appelle aujourd'hui l'»autopurification« du sol, des rivières et de la mer; et ce n'est plus l'agriculture seule qui la met à profit, mais l'industrie l'applique en grand dans la »purification biologique« des eaux d'égoût des villes, à coup sûr un des progrès hygiéniques les plus importants qui aient jamais été réalisés.

Comme la quantité d'acide carbonique présente dans l'air reste à peu près con-

stante, et qu'il n'y a aucune raison d'admettre la possibilité d'une augmentation ou d'une perte par l'espace universel, il faut qu'il y ait en quelque sorte équilibre entre la quantité qui passe de la surface du sol dans l'atmosphère, en flot ininterrompu, par la »minéralisation«, et celle qui se fixe dans les plantes vertes; car les observations de de Saussure et les calculs de Schleiden ont appris que toutes les autres sources d'acide carbonique, telles que la respiration des hommes et des animaux ainsi que la combustion du bois et de la houille pour le chauffage, ne fournissent qu'un dixième tout au plus de la quantité d'acide mise en liberté par les microbes. Seule l'émission d'acide carbonique par l'action des volcans est un facteur qui nous est encore inconnu.

On conçoit aisément que, si la terre était privée des microbes, il en résulterait bientôt des conditions désavantageuses pour les êtres supérieurs. Par suite de la réduction dans les plantes vertes, la teneur en acide carbonique de l'atmosphère s'abaisserait rapidement et la végétation commencerait à languir; mais il se serait produit déjà d'abord un arrêt dans la destruction de la matière organique; la chute des feuilles sur le sol, par laquelle il se dépose p. e. annuellement, dans un bois de hêtres, environ 4000 kilos de substance sèche par hectare, — une quantité qui maintenant est précisément égale à ce que les microbes sont capables de minéraliser, — donnerait lieu à une énorme accumulation. Les graines, en tombant à terre, n'y trouveraient plus un endroit favorable à leur germination; le flot alimentaire des arbres ne contiendrait plus de sels ou du moins n'en contiendrait pas assez, et les forêts disparaîtraient de la surface du globe. Le même sort frapperait, plus lentement peut-être mais tout aussi sûrement, chaque autre formation de plantes. En même temps la diminution de l'acide carbonique dans l'atmosphère, qui abaisserait le pouvoir absorbant pour la chaleur, ainsi qu'il résulte des recherches de M. Arrhenius, aurait comme conséquence une période glaciaire sur toute la terre.

Dans la mer aussi le manque d'acide carbonique se ferait sentir; la »nourriture primordiale«, composée essentiellement de Diatomées et d'autres algues inférieures, n'augmenterait plus et bientôt on ne pourrait plus dire des eaux vivantes: »rien n'est proie de la mort, tout est proie de la vie«, — là aussi la mort triompherait.

Ainsi donc, bien loin de s'opposer à la vie, les microbes sont précisément les travailleurs, cachés mais infaillibles, qui rendent possible la vie sous toutes ses formes.

Mais l'utilité des microbes ne se borne pas à la conservation de l'équilibre atmosphérique. L'acide carbonique qu'ils développent dans les couches superficielles du globe exerce sur les plantes supérieures d'autres influences encore, fort bienfaisantes. C'est son action qui conduit à la désagrégation des minéraux, par laquelle les divers silicates, en se décomposant partiellement, donnent naissance aux zéolithes si importants pour la fertilité du sol, parce qu'ils contiennent le potassium et l'acide phosphorique sous une forme qui les rend facilement assimilables. Mais il y a plus. On a constaté que la teneur normale en acide carbonique de l'air atmosphérique, d'environ 3½ dix-millièmes, est bien au-dessous de ce que l'on a trouvé comme optimum pour l'assimilation carbonique chez les plantes vertes; cet optimum est en effet de 3 à 4%, c. à d. une quantité cent fois plus grande que la quantité normale. Mais, précisément par la vie particulièrement intense des microbes, l'air du sol contient toujours une forte proportion de ce gaz, souvent même 3 à 5%, d'où il résulte que la couche d'air recouvrant immédiatement le sol, particulièrement l'air compris entre les feuilles de

plantes croissant en société et qui n'est presque pas agité par le vent, est beaucoup plus riche en acide carbonique que les couches plus élevées. Cette circonstance favorise considérablement, sans aucun doute, la croissance exubérante de toute végétation dense, et dans la lutte pour l'existence elle doit avoir constitué un facteur dans l'adaptation chez les espèces plastiques. Elle nous renseigne sur la signification des belles rosettes de feuilles appliquées contre le sol, que l'on observe chez nombre de plantes appartenant aux familles les plus diverses, et qui, au point de vue de leur structure et de leur situation, ne sauraient être organisées d'une façon plus avantageuse pour absorber l'acide carbonique de l'air du sol.

En appliquant ces faits, dont l'importance pratique n'échappera à personne, à la culture des plantes en serres fermées, c. à d. en favorisant la croissance par une augmentation artificielle de la proportion d'acide carbonique dans l'air, on devrait tenir compte en même temps de la quantité de lumière disponible puisque, à partir d'une certaine teneur en acide carbonique, la lumière du jour devient insuffisante pour sa décomposition, de sorte que son intensité devrait être augmentée par exemple au moyen de lumière électrique.

La vie des microbes dépend jusqu'à un haut degré des substances sur lesquelles ils agissent et dont ils se nourrissent; parmi ces substances, celles-là surtout sont importantes qui sont présentes en grandes quantités, et qui ne se transforment que lentement sous l'influence de la vie microbienne. A ces exigences satisfont en premier lieu les corps qui constituent les parois cellulaires des feuilles, des tiges et des racines des plantes supérieures, et en second lieu les matières albuminoïdes provenant du protoplasme des cellules mortes. C'est donc de ces substances que nous allons nous occuper particulièrement.

En ce qui concerne la nature chimique des parois des cellules végétales, cette nature varie avec la situation anatomique et la fonction physiologique des tissus considérés de la plante. Outre la *cellulose,* qui paraît ne faire défaut nulle part, on trouve encore, dans l'épiderme et dans les couches corticales, la *subérine* et quelques autres corps présents en moindre quantité, tandis que le caractère particulier du bois est déterminé par la *lignose* et la *pentosane,* que l'on y trouve mélangées avec la cellulose.

La manière dont les microbes attaquent ces divers corps n'est pas encore parfaitement connue; ce sont les transformations subies par la cellulose qui ont été examinées avec le plus de soin.

A la température moyenne des climats tempérés et chauds, et à un degré d'humidité suffisamment élevé, cette substance si stable au point de vue chimique est facilement décomposée par plusieurs espèces de microbes qui peuvent la transformer complètement de diverses façons. Les produits ultimes de cette transformation sont de l'eau et de l'acide carbonique quand elle s'opère sous l'influence d'organismes aérobies; de l'acide carbonique, de l'acide acétique et de l'acide butyrique, ou de l'hydrogène, de l'acide carbonique et du méthane, quand elle a lieu sous l'action de bactéries anaérobies; enfin, quand il y a des nitrates en présence et que l'air n'a pas librement accès, certains microbes de la dénitrification produisent de l'azote libre et de l'acide carbonique.

Les deux premières transformation sont de beaucoup les plus importantes pour la fertilité du sol, parce que c'est en principe sur elles qu'est basée la fixation de l'azote libre de l'atmosphère.

Les quantités prodigieuses d'hydrogène et de gaz des marais que les microbes anaérobies forment, partout et toujours, aux dépens de la cellulose, pourraient faire croire que ces gaz doivent s'accumuler dans l'atmosphère; pourtant, les déterminations précises de M. Gautier ont appris qu'ils n'y existent qu'à l'état de traces. Pour ce qui regarde l'hydrogène, on pourrait peut-être expliquer sa disparition en admettant comme possible sa diffusion dans l'espace universel; mais une telle explication n'est certainement pas applicable au méthane, dont la densité est la moitié de celle de l'oxygène et qui, d'après tout ce que nous savons ne saurait donc quitter notre atmosphère. Comme ce gaz se développe en quantités bien plus considérables encore que l'hydrogène, si considérables même qu'on a pu l'exploiter dans les dernières années, sous le nom de »brongas« (gaz minéral), dans les polders de la Hollande septentrionale et le faire servir çà et là pour l'éclairage et le chauffage, il faut évidemment qu'il y ait une cause générale qui le fasse disparaître de l'atmosphère, et il est probable qu'ici encore ce sont des plantes vertes qui se chargent de cette fonction. Ces plantes vertes peuvent, en effet, se nourrir non seulement avec de l'anhydride carbonique mais parfaitement aussi avec de l'oxyde de carbone, de sorte que rien ne s'oppose à l'hypothèse que certaines espèces soient également capables de se rendre maître du carbone contenu dans le gaz des marais.

Rien n'est caché pour l'oeil de la science. Un germe isolé, un seul microbe échappe à l'observation directe, mais il devient observable du moment que, grâce à une bonne nutrition, il peut se multiplier et l'unité se transformer en milliers. Quand ces milliers restent au même endroit, comme c'est le cas dans la méthode de culture sur un terrain nourricier solide, introduite par M. Koch, l'oeil nu peut distinguer le nombre, la colonie, là où le microbe isolé passait inaperçu. Dans ces conditions on reste indépendant de la grandeur absolue des germes; même ce qui était encore au-dessous de la limite de visibilité microscopique doit devenir, par segmentation répétée, une quantité visible. L'étude microscopique a pourtant appris que des microbes, si petits qu'on ne peut les distinguer individuellement, même par les plus forts grossissements, sont excessivement rares; ils ne se présentent que dans quelques maladies contagieuses, et même dans ces cas-là il est probable qu'on pourra les voir quand les moyens d'observation se seront encore améliorés [1]).

Pour le sol il n'y a pas lieu d'admettre l'activité de pareils microbes invisibles.

Pour pouvoir se reproduire, la plupart des microbes du sol doivent être nourris des mêmes substances minérales que les végétaux supérieurs, mais ils ont en outre besoin d'un corps organique comme source de carbone. Si cette source de carbone est la cellulose, on peut s'attendre, quand la réaction est acide, à ce qu'il se développe des moisissures, et des bactéries quand la réaction est alcaline.

En tenant compte de ces considérations générales, on peut laisser la nature elle-même donner une réponse nette à la question de savoir quelles sont les moisissures et quelles sont les bactéries qui se nourrissent de cellulose, et sont donc les agents de sa transformation dans le sol.

Voici comment on opère pour découvrir la flore des moisissures de la cellulose.

On prend quelques morceaux de papier à filtrer, ou d'étoffe de lin ou de coton,

---

[1]) Les »contagia fluida«, dont il n'est pas question ici, sont tout autre chose.

toutes substances formées de cellulose pure; on les imbibe d'une solution diluée de monophosphate de potassium et de nitrate d'ammonium, p. ex. $^1/_{10}$% de ces deux sels, dans l'eau de la distribution; par sa provenance, cette eau contient déjà une quantité suffisante des autres matières nutritives minérales, nécessaires aux microbes, telles que le magnésium, le soufre et le fer. Le morceau de papier, ainsi préparé, est mis dans une boîte de verre pour prévenir la dessication, et on y verse un peu d'eau où l'on a introduit d'avance, à l'état de poussière fine, le sol ou l'humus dont on se propose de cultiver les moisissures de la cellulose; cela fait, on n'a plus qu'à abandonner la préparation à elle-même, en la maintenant à une température d'environ 25° C. Au bout de deux semaines les germes des moisissures se développent vigoureusement, et donnent naissance à de grandes et élégantes colonies où nous trouvons la même flore particulière qui, dans les sombres recoins du sol, travaille sans cesse à la minéralisation de la cellulose des feuilles mortes, des tiges et des racines, pour régénérer les substances alimentaires des végétaux supérieurs.

Comme il se produit dans cette transformation de la cellulose nouvelle, faisant partie de la substance de l'organisme même, notamment des filaments mycéliens des moisissures, il n'est pas étonnant que le papier ou l'étoffe, même complètement décomposés, ne perdent pas toute consistance; il reste un tissu serré, formé par la masse cohérente de ces microbes. Mais cette masse meurt bientôt à son tour et est alors soumise à de nouvelles transformations, sous l'influence d'un autre monde microbien — d'autres chaînons dans le grand enchaînement des phénomènes naturels.

De petits changements dans les conditions nutritives suffisent à modifier considérablement la nature de l'association de microbes qui se développe. Dans le cas qui nous occupe, il suffit de remplacer la source d'azote, le nitrate d'ammonium, par le phosphate double d'ammonium et de magnésium, faiblement alcalin, et le phosphate acide de potassium par le phosphate basique, pour empêcher la croissance de la plupart des moisissures de la cellulose, et rendre possible le développement de la flore des bactéries de la cellulose, composée de quelques espèces seulement.

Quand on humecte le papier ou la toile, ainsi rendus alcalins, de quelques gouttes d'un extrait de feuilles à moitié décomposées et réduites en poussière, et que l'on cultive à 30° C., on voit se former, au bout de peu de jours, les colonies de la plus importante des bactéries de la cellulose, le *Bacillus ferrugineus,* qui surgissent en divers endroits de la surface blanche en taches couleur de rouille, constituées par de très petits bâtonnets, la plupart très mobiles et incolores eux-mêmes, mais sécrétant un pigment brun imbibant des fibres et se séparant parfois à l'état de cristaux. Le rôle de cet organisme aérobie dans la disparition de la cellulose contenue dans le sol est important sans aucun doute, et comparable à celui des moisissures en ceci, qu'il se forme aussi de l'anhydride carbonique et de l'eau comme produits ultimes de la décomposition.

Une conclusion remarquable que l'on peut tirer de ces recherches c'est que, quand elle est suffisamment humide, la cellulose ne se transforme pas en substances humiques. Pour en corroborer la preuve on a pris de grands morceaux de papier à filtrer et des lambeaux de toile et de coton, que l'on a placés entre des plaques d'asbeste blanche; on les a enfouis, en automne, à diverses profondeurs dans une terre molle de jardin, et à la fin de l'hiver on n'a retrouvé de ces substances qu'un tissu de filaments mycéliens incolores, appliqués contre l'asbeste restée blanche. Il est prouvé

par là qu'il ne s'était pas formé d'humus, que l'on n'aurait pas manqué de reconnaître à sa coloration brune.

La question suivante se présente donc en quelque sorte d'elle-même: Si ce n'est pas la cellulose qui est le point de départ dans la formation des constituants non azotés de l'humus, c. à d. de sa majeure partie, quelles sont donc les substances qui leur donnent naissance?

Les corps solubles contenus dans les cellules, tels que les sucres, les acides et sels organiques et l'amidon se transforment dans le sol beaucoup plus facilement encore que la cellulose, et les expériences ont appris d'ailleurs qu'ils ne constituent pas la matière première dont est formée la masse principale de l'humus. Ce ne sont que les combinaisons solubles du tannin, présentes il est vrai en quantités relativement petites, qui participent, d'après M. Adolphe Mayer, à la formation de l'humus.

Mais nous venons de voir qu'aux substances végétales les plus répandues appartiennent la subérine des épidermes et des tissus corticaux, et la lignose et la pentosane du bois; et il certain que c'est de ces substances-là, surtout du bois, que provient la masse principale de l'humus.

Le bois, qui comprend aussi les réseaux des nervures foliaires et les faisceaux ligneux des tiges et des racines herbacées, ne se décompose que très lentement à l'intérieur et hors du sol, parce qu'il n'y a que peu de microbes qui l'attaquent, appartenant au groupe des champignons lignicoles, qui enlèvent par leurs filaments mycéliens la cellulose aux parois des fibres et des vaisseaux ligneux, en abandonnant la lignose dont ils ne peuvent se nourrir et qui se transforme plus tard en humus, sous des influences d'ordre purement chimique à ce qu'il paraît. La facilité avec laquelle la lignose est attaquée par divers réactifs chimiques, auxquels la cellulose résiste parfaitement, rend cette manière de voir admissible; de plus, la nature aromatique de la lignose, qui est un produit dérivé du tétrahydrobenzol, explique pourquoi ce corps est assimilé difficilement par les microbes. D'après cette conception la plupart des substances humiques appartiennent, selon toute probabilité, aux corps aromatiques.

On ne sait pas encore au juste ce qu'il advient de la pentosane, le troisième élément constitutif des tissus ligneux, lors de la désagrégation du bois; mais M. Tollens a fait voir que dans les tourbières elle disparaît avant la lignose, ce qui fait qu'une vieille tourbe doit être exclusivement produite par cette dernière substance. Pour le vieil humus en général, la même conclusion semble nécessaire.

Au sujet des derniers produits de la décomposition des épidermes et des tissus corticaux, on est encore dans l'incertitude, mais il est indubitable que le mycélium de certaines moisissures participe à cette décomposition et contribue par là à la formation d'humus.

Ainsi que je l'ai déjà fait observer, le deuxième constituant, difficilement décomposable, des plantes mortes, qui par sa quantité, et surtout par sa composition, est très important pour la fertilité du sol, consiste dans les corps albuminoïdes, qui prennent naissance après la mort du protoplasme. A vrai dire il y a là deux groupes de corps, dont les uns sont aisément attaqués par les microbes, tandis que les autres résistent à leur action ou ne sont attaqués qu'à la longue. C'est ainsi que des expériences de fumigation, entreprises par Boussingault, ont appris que les albuminoïdes végétaux contenus dans les tourteaux de colza contiennent à peu près 20% d'une matière azotée qui ne subit aucune transformation ultérieure. Bien que la na-

ture chimique de ces substances remarquables soit encore inconnue, il est certain que c'est précisément à leur présence que l'on doit attribuer la forte proportion d'azote que l'on trouve dans les terrains riches en humus, comme le terreau de jardin ordinaire, ainsi que dans la tourbe, proportion qui atteint assez souvent 4% du poids de matière sèche. Dans des climats chauds et secs cette proportion peut devenir bien plus élevée encore. Dans un vieil humus de la Californie, formé dans des conditions de faible humidité et d'aération active, M. Hilgard a même pu constater une teneur en azote de 15%, présente probablement dans une substance semblable à la chitine, et qui constitue les parois de certains filaments mycéliens. Puisque ces substances azotées aussi constituent une partie intégrante de l'humus, il n'y a pas lieu de s'étonner de la nature complexe de ce corps, et l'on conçoit aussi que, avant de tirer de la teneur

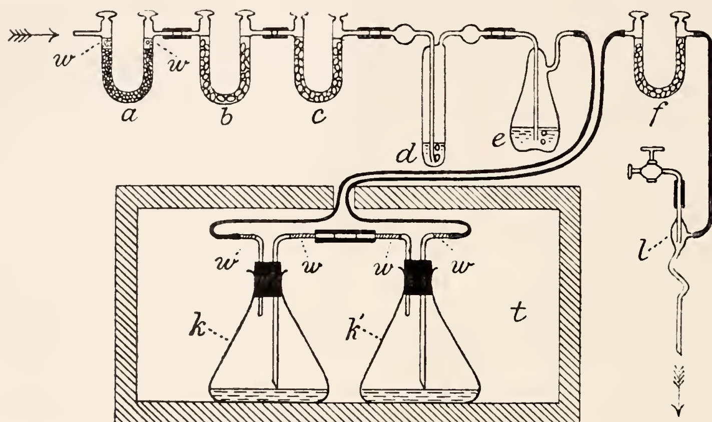


Fig. 1. Appareil pour la fixation de l'azote atmosphérique libre avec la cellulose comme source de carbone; *a* chaux sodée; *bcf* ponce imbibée d'acide sulfurique dilué; *d* acide sulfurique concentré; *e* eau; *kk'* flacons de culture avec cellulose dans le thermostat *t*; *l* trompe; *ww'* tampons d'ouate.

en azote d'un sol une conclusion relative à sa fertilité, on doit se rendre compte tout d'abord de la composition qualitative des combinaisons dans lesquelles cet azote se présente.

Les transformations que subit la partie aisément attaquable des albuminoïdes, sous l'influence des microbes, nous allons les considérer en même temps que les changements analogues que subissent les albuminoïdes, résultant du protoplasme des corps morts des microbes eux-mêmes, ou formés sous leur influence immédiate, comme produit de la fixation de l'azote atmosphérique libre.

Cette fixation particulièrement importante pour la fertilité s'observe dans la nature sous deux formes différentes, en premier lieu comme conséquence du développement de certaines espèces de microbes qui, en présence d'une nourriture carbonique appropriée, satisfont leur besoin d'azote en assimilant l'azote libre de l'atmosphère, en second lieu comme conséquence de la symbiose de certains microbes avec les racines des Papilionacées.

G. J. Mulder connaissait déjà le premier de ces deux processus, et c'est avec raison qu'il l'a mis en rapport avec la décomposition des substances organiques. Cette décomposition s'opère sous l'action combinée, harmonique, d'au moins trois espèces différentes de bactéries, et la source de carbone, qui paraît être leur nourriture carbonique par excellence, est précisément la cellulose. Ces trois espèces ne peuvent être efficacement actives que si la pression de l'oxygène est quelque peu diminuée; il s'ensuit que, dans des conditions artificielles, ce biochimisme doit s'opérer dans une couche liquide d'épaisseur telle que l'oxygène de l'air y puisse être consommé aussi rapidement qu'il y pénètre, tandis que dans le sol il ne s'opère pas à la surface, mais à une certaine profondeur, faible il est vrai.

La fixation d'azote ne s'opérant que lentement, l'air servant à des expériences de laboratoire, dont la durée est de quelques semaines, doit d'abord passer par un mélange de soude caustique et de chaux et par de l'acide sulfurique dilué et concentré, pour être privée de toute combinaison azotée. Afin que la réaction du liquide reste toujours alcaline, ce qui est nécessaire pour la fixation, on ne peut y introduire qu'une petite quantité de cellulose, autrement sa consommation rapide produirait trop d'acides. Le mélange suivant convient très bien à l'expérience: 100 parties d'eau de conduite, 2% de papier à filtrer pur et finement divisé, 2% de craie et $^1/_{20}$ de biphosphate de potasse, tandis qu'une trace de terreau est nécessaire pour introduire les bactéries fixatrices d'azote, qui paraissent exister partout et qui se développent le mieux vers 25° à 30°. On voit par là que les conditions nécessaires pour le processus existent en divers endroits dans le sol.

Les trois espèces de bactéries actives sont: en premier lieu l'agent (*Fh,* fig. 2) de la fermentation acéto-butyrique de la cellulose que l'on pourrait également appeler le »ferment hydrogénique«, parce qu'il se forme toujours de l'hydrogène comme produit accessoire. Ce microbe se présente comme de courts filaments ou des bâtonnets, collés contre les fragments de cellulose (*fi*) et pouvant former à leur extrémité une petite spore oblongue ou ronde. En second lieu une espèce de bactéries, apparentée de près aux bactéries des racines des Papilionacées, et que j'appelle *Bacillus radiobacter* (*Ra*) à cause de la façon particulière dont les bâtonnets se ramifient et se disposent. Enfin, en troisième lieu, une espèce du genre remarquable *Azotobacter* (*Az*) qui, par les grandes dimensions de ses bâtonnets et l'excessive rapidité avec laquelle elle se reproduit, constitue de beaucoup la plus grande partie de la masse bactérienne nouvellement formée.

Voici comment ces trois espèces se partagent le travail. Le ferment hydrogénique attaque seul la cellulose et la transforme, par l'action d'un enzyme, en une espèce de sucre qui entre en partie en fermentation, par le ferment lui-même, et donne naissance à de l'acide acétique, de l'acide butyrique, de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène; les acides acétique et butyrique forment des sels avec la chaux contenue dans le sol. Une autre partie de ce sucre sert de source de carbone aux deux autres espèces de bactéries, qui peuvent se nourrir en outre des deux sels ainsi formés mais en aucune façon de la cellulose même. De ces deux espèces c'est le *Bacillus radiobacter* qui est le véritable fixateur d'azote, mais, au lieu de garder pour lui seul l'azote qu'il a fixé, il en fait une substance azotée soluble, qui se répand dans le liquide environnant ou dans le sol, où elle peut servir de source d'azote pour divers organismes auxquels appartiennent précisément, dans le cas qui nous occupe, le ferment hydrogéni-

que et l'*Azotobacter*. Ces derniers organismes se servent de cette nourriture azotée pour former leur protoplasme, dont il reste, après la mort, une matière albuminoïde qui provient surtout de l'*Azotobacter*, parce que par sa masse cette espèce l'emporte de beaucoup sur toutes les autres. Comme l'*Azotobacter* peut oxyder, à l'état d'anhydride carbonique et d'eau, non seulement les sels des acides acétique et butyrique, mais encore ces acides eux-mêmes, cet organisme doit aussi avoir quelque importance en maintenant neutre la réaction du milieu environnant.

La quantité d'azote libre, qui peut être fixée de cette manière, est considérable, car une vingtaine de déterminations, effectuées dans mon laboratoire par M. G. van Iterson, ont appris qu'elle peut atteindre 8 à 9 milligrammes pour chaque gramme de cellulose décomposée; ce qui donnerait annuellement, par exemple dans un bois de hêtres fournissant 4000 kilos de feuilles sèches, un gain d'azote d'environ 25 kilos par hectare.

Il n'y a pas à en douter, cette source universelle de combinaisons azotées, si elle ne suffit pas aux exigences d'une culture intensive, est du moins plus que suffisante pour satisfaire au besoin d'azote des plantes supérieures dans les conditions naturelles, par exemple pour les forêts dont le bois est régulièrement exploité. Il est même certain qu'il en résulterait une accumulation d'azote désavantageuse pour la végétation, si les bactéries de la dénitrification ne se chargeaient pas de ramener à l'état de gaz une partie de l'azote fixé, après la transformation des corps albuminoïdes en nitrates, par la nitrification.

Cette conclusion, relative à l'influence des bactéries dénitrifiantes dans le cycle des transformations de l'azote, est inévitable quand on songe à la grande ténacité avec laquelle cet élément reste dans ses combinaisons, comparativement à toutes les autres actions chimiques qui s'opèrent dans le sol, ce qui fait qu'à notre connaissance la dénitrification est le seul processus de destruction universel qui compense la formation incessante de combinaisons azotées. Si cette destruction avait fait défaut nous constaterions, dans le cours des périodes géologiques, une accumulation de ces matières bien plus considérable et bien plus générale que ne nous offrent maintenant les gisements de salpètre et de guano, qui ont dû prendre naissance seulement dans des conditions locales et rarement réalisées.

M. Brandt est arrivé à la même conclusion pour ce qui regarde la mer. Sans les bactéries de la dénitrification, qui là aussi existent partout, le salpètre que les rivières y déversent s'y serait accumulé au point que la vie organique y aurait disparu depuis longtemps.

Ce n'est que dans les derniers temps que le passage de l'azote atmosphérique libre à l'état de combinaison, sous l'influence des microbes seuls, a été reconnu comme un phénomène naturel de grande importance; mais déjà en 1886 les remarquables recherches de Hellriegel, au laboratoire d'agriculture de Bernburg, avaient donné la certitude que les plantes papilionacées acquièrent le pourvoir de fixer l'azote de l'air, quand certaines espèces de bactéries du sol pénètrent dans leurs racines et y donnent naissance à des excroissances en forme de tubercule (fig. 3). L'expérience actuellement acquise nous permet de décrire comme suit ce qui se passe dans ces racines.

Certaines bactéries très petites (fig. 7) et qui ne sont pas universellement répandus dans le sol, pénètrent, d'une façon qui n'a pas encore été suffisamment élucidée, dans quelques-unes des cellules des jeunes racines de la plante (pois,

trèfle, vesce, lupin, serradella etc.), et provoquent une segmentation excessive et tout à fait anormale de ces cellules (fig. 4), donnant ainsi naissance à des excroissances plus ou moins fortement développées, les tubercules bien connus, que l'on peut considérer comme des racines latérales métamorphosées. Les bactéries se multiplient rapidement dans le tissu intérieur de ces tubercules, dont le contenu cellulaire finit par être une combinaison des substances vivantes constitutives de deux organismes de nature aussi différente que possible: d'une bactérie et d'une plante supérieure. Bientôt les bactéries subissent des modifications très considérables, tant au point de vue de la forme qu'au point de vue de leurs propriétés: elles finissent par ressembler quelque peu aux groupements étoilés de *Bacillus radiobacter* et perdent le pouvoir de se développer en dehors des cellules de la plante qu'elles habitent. C'est dans cet état qu'on leur donne le nom de »bactéroïdes« *(Bt)* et le tissu de la plante qui les contient est le »tissu à bactéroïdes« *(Bt* fig. 5). Bien qu'incapables de se reproduire, ces »bactéroïdes« doivent néanmoins être considérés comme des êtres vivants, et ils possèdent le pouvoir de produire, moyennant le concours du protoplasme des cellules nourricières, qui apportent la nourriture carbonique nécessaire à leur nutrition, — probablement un hydrate de carbone, — une combinaison azotée aux dépens de l'azote libre venant de l'extérieur; ils cèdent ce produit à la plante qui en est pénétrée, au point que toutes ses parties, tant aériennes que souterraines, sont mises en état de se développer davantage et de se fournir de composés azotés plus compliqués.

Tout comme dans le cas du *Bacillus radiobacter,* la nature de la substance sécrétée par les bactéroïdes est encore inconnue, mais la grande analogie qui existe entre les rapports de la première espèce avec *Azotobacter* d'une part et ceux des bactéroïdes avec le protoplasme des racines des Papilionacées d'autre part, nous donne le droit d'attendre que l'explication complète de la première relation, qui se prête mieux que l'autre à des recherches expérimentales, fera aussi la lumière sur la seconde.

De même que *B. radiobacter,* dont elles sont de si proches parents, les bactéries des racines des Papilionacées (fig. 7) sont, à l'état libre, des bâtonnets très fins, mobiles ou immobiles, ayant une forte tendance à former du mucus (*Mu* fig. 5). Elles se laissent cultiver aisément, en dehors de la plante, sur un terrain de culture solide composé d'une décoction de l'une ou l'autre plante, p. ex. de feuilles de pois ou de trèfle, à laquelle on a ajouté 2% de sucre de canne et 10% de gélatine, c. à d. contenant aussi bien une source de carbone que de l'azote combiné, ce qui est indispensable pour ces expériences de culture, puisque les bactéries des Papilionacées ne sont capables de fixer l'azote libre que dans l'intérieur des racines de ces plantes. Aussi la formation des bactéroïdes ne s'observe-t-elle pas, dans ces cultures artificielles, si ce n'est d'une façon très incomplète.

La grande influence de la plante nourricière sur ces remarquables produits se manifeste encore d'une tout autre manière, dont le fait suivant donne la preuve. Tandis qu'il est prouvé que c'est précisément la même espèce de bactérie qui pénètre dans la racine du trèfle et dans celle de la vesce, les bactéroïdes du trèfle (*Btt,* fig. 6) sont globuleux ou pyriformes, alors que ceux de la vesce (*Btv*) sont ramifiés. Mais ce fait n'est pas unique, une vraie infinité de cas analogues pourrait être citée.

Les bactéries des Papilionacées présentent encore entr'elles des différences notables d'espèce. C'est ainsi que l'on trouve chez le serradella et le lupin jaune des organismes bien différents de ceux des racines des autres Papilionacées, très rares

dans le sol et ne se rencontrant abondamment que là où les plantes en question ont déjà été cultivées antérieurement. Ce fait explique la circonstance suivante. Si l'on veut défricher une nouvelle portion de bruyère ou de sable des dunes pauvre en azote combiné, et que l'on se propose d'y introduire de l'azote au moyen de serradella ou de lupin, on doit opérer d'abord une infection artificielle avec quelques charretées d'une terre provenant d'un ancien champ de serradella ou de lupin, car on peut être certain que, sans cette précaution, et quoique les bactéries vulgaires des Papilionacées soient présentes en nombre suffisant, ces plantes ne se développeraient pas par défaut de leurs symbiontes propres.

Il règne cependant encore beaucoup d'incertitude au sujet de l'état dans lequel doivent se trouver les bactéries des Papilionacées pour que l'infection d'espèces déterminées de ces plantes soit suivie d'une fixation d'azote satisfaisante, et il devient de plus en plus probable que le rendement d'azote des plantes de culture ordinaires, telles que les pois, les haricots, le trèfle et la vesce, dont les bacilles se rencontrent partout, il est vrai, mais le plus souvent sous une forme peu virulente, comme on l'appelle, pourrait être amélioré en employant pour l'infection des formes plus actives. La difficulté réside toutefois en ceci que l'on ne connaît pas encore exactement les causes qui déterminent cette virulence. On peut bien tenir pour certain que la pression de l'oxygène a une influence prédominente, mais à un point de vue bactériologique il est très difficile de régler exactement cette pression, et le mieux est encore de laisser à la nature une liberté aussi grande que possible, c. a d. de permettre l'influence de facteurs dont on ne saurait tenir compte, ce qui exclut évidemment une intervention rationelle. Il est bien certain qu'en employant des cultures pures on n'obtient généralement aucun résultat. Voilà ce que prouvèrent, il y a plusieurs années déjà, les expériences entreprises à Bernburg par feu le Prof. Hellriegel, à l'aide des cultures pures que j'avais obtenues à Delft; nous avons toujours observé avec elles une croissance moins forte des plantes d'expérience et une fixation d'azote moins grande que quand l'infection avait été faite, simplement et grossièrement, au moyen de racines et de tubercules radicaux broyés, ou même rien qu'avec le sol où les Papilionacées en question s'étaient développées antérieurement. Plus tard ce résultat négatif a été confirmé en grand à l'aide des cultures pures, appelées »nitragine« par les intéressés, et que l'on a introduites dans le commerce fort mal à propos, mais qui ont eu du moins cette utilité, que les expérience que l'on a faites avec elles ont fait comprendre combien il était nécessaire de connaître la nature de la virulence, et d'organiser dans les laboratoires agronomiques des recherches systématiques à ce sujet.

Le produit final de la fixation de l'azote libre, de quelque manière qu'il ait été obtenu, est, comme nous venons de le voir, du protoplasme vivant, appartenant soit à la cellule microbienne, comme dans le cas de la combinaison *Radiobacter-Azotobacter*, soit à la cellule végétale, comme dans le cas des Papilionacées. La mort de la cellule fait que le protoplasme se transforme en matière albuminoïde. Mais, comme les plantes supérieures sont incapables d'assimiler cette substance, elle serait perdue dans le sol s'il n'y avait partout certains microbes capables de la transformer en ammoniaque, et d'autres microbes encore transformant cette ammoniaque en nitrates par la nitrification.

La formation d'ammoniaque, ou plus exactement de carbonate d'ammonium, aux dépens de matières albuminoïdes est une fonction excessivement répandue dans le

monde des microbes, et à coup sûr la plus importante de toutes les phases de minéralisation des corps organiques. Les espèces de microbes les plus diverses, et les plus communément répandues dans le sol, se chargent de cette fonction; par exemple des moisissures ordinaires (Fig. 8, A, 1) quand le milieu ambiant est quelque peu acide, ainsi que les »levures rouge« (A, 2) et »blanche« du sol, appartenant au groupe des Blastomycètes. Dans le cas d'une réaction alcaline ce sont surtout des bactéries qui sont actives, notamment les espèces les plus vulgaires, comme *Bacillus fluorescens liquefaciens* (A, 3). Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que les matières albuminoïdes, de provenance tant animale que végétale, et même celles qui proviennent des microbes eux-mêmes, soient des substances très passagères dans le sol, — tout comme dans les eaux d'ailleurs, — avec cette restriction toutefois qu'un cinquième environ en est difficilement attaquable.

La façon dont s'opère cette transformation de l'albumine n'est pas encore connue dans tous ses détails, mais on sait qu'elle consiste en deux actions différentes. Dans la première l'albumine est rendue soluble par des enzymes peptonisants, élaborés par certains microbes, et c'est dans la seconde qu'il se forme de l'ammoniaque, à l'intérieur du corps des microbes, aux dépens de l'albumine peptonisée et dissoute. Les sels ammoniacaux qui se forment de cette façon peuvent parfois être transportés à de grandes distances par des filaments de mycélium; dans d'autres cas ils sont immédiatement mis en liberté hors de la cellule.

Les combinaisons ammoniacales, non seulement celles qui ont pris naissance dans le sol même, mais encore toutes celles qui y ont été introduites d'autre manière, subissent des transformations ultérieures par les organismes de la nitrification, dont l'influence sur la fertilité est des plus grandes.

C'est vers 1891 que M. Winogradsky a découvert ces remarquables bactéries et a fixé leurs conditions vitales. Il a fait voir qu'elles ne sont capables de former des nitrates que dans le cas où les solutions nutritives employées ne contiennent presque pas de substances organiques en dissolution. Cela veut dire que les microbes nitrifiants croissent et agissent précisément là où la nourriture manque pour les microbes ordinaires; et ce sont eux qui rendent instables les combinaisons ammoniacales, même dans l'eau pure. Dans le sol la quantité de substances organiques solubles est généralement assez petite pour ne pas empêcher la nitrification; des substances difficilement solubles, comme la cellulose, ne la gênent pas, ce qui fait que dans des détritus de feuilles et dans l'humus des bois ce processus peut s'opérer sans interruption.

La nitrification s'opère en deux phases, auxquelles correspondent deux espèces de bactéries. La première, — le ferment des nitrites (fig. 8, B), — oxyde les sels ammoniacaux en formant de l'acide nitreux libre, qui se combine à l'état de sel avec la potasse ou la chaux contenue dans le sol; la deuxième, — le ferment des nitrates (fig. 8, C), — transforme le nitrite ainsi formé en nitrate, par une nouvelle addition d'oxygène.

Il est aisé de cultiver le ferment des nitrites sur des plaques d'agar à carbonate de chaux, bien lavées et imbibées d'un peu de phosphate de potassium et de chlorure d'ammonium; on obtient alors des colonies jaune citron ou brunâtres, formées de bactéries globulaires munies d'un long cil.

Le ferment des nitrates est de toute autre nature; il se présente comme une bactérie très petite, difficilement visible, dont on n'a pas encore pu obtenir avec certitude

une culture pure, privée de bactéries étrangères. Ce ferment est surtout remarquable par la quantité minimale qui s'en trouve dans des solutions de nitrite fortement nitrifiantes, où il est presque introuvable par les méthodes microscopiques, et qui, à l'oeil nu, ont tout à fait l'air d'être absolument privées de bactéries. Peut-être la vie organique ne fournit-elle pas d'autre exemple d'un processus chimique d'une telle intensité mis en train par une si petite quantité de matière vivante.

Les conditions physiques capitales de la nitrification sont une forte humidité et un libre accès de l'air; si l'aération est incomplète le salpètre formé dans le sol peut même disparaître rapidement sous l'action des bactéries de la dénitrification. Ces circonstances sont tellement importantes que le but principal du travail de la terre dans l'agriculture doit être de donner au sol une telle structure que l'oxydation y soit partout favorisée et la réduction diminuée autant que possible.

Comme les plantes supérieures s'emparent avec avidité du salpètre, on retrouve cette substance avec la plus grande facilité dans les plantes elles-mêmes, qui commencent par l'amasser pour ne la faire servir que plus tard à la formation d'autres combinaisons azotées; — parfois même cette transformation n'a pas lieu. Chez les plantes herbacées surtout, l'accumulation de salpètre dans les tissus est souvent tellement considérable qu'après l'enfouissement leur feuillage vert peut être considéré non seulement comme »engrais à matière albuminoïde«, mais encore comme »engrais à salpètre«. Le moyen le plus facile de se rendre compte de la teneur en nitrate du sol est d'ailleurs de chercher ce corps dans les plantes qui y croissent, en découpant à diverses hauteurs dans la tige des plaques que l'on plonge dans une solution de sulfate de diphénylamine; l'intensité de la coloration bleue donne la mesure de la richesse en salpètre de la plante, donc aussi du sol.

Dans des conditions ordinaires, la nitrification exige non seulement la présence des ferments actifs proprement dits, mais encore celle d'autres microbes vulgaires, qui en assurent la régularité par la minéralisation des substances organiques. Il s'ensuit qu'il n'y a pas moins de sept à huit espèces de bactéries, à propriétés et fonctions très différentes, qui doivent opérer simultanément, et dans un ordre exactement déterminé, pour effectuer le passage de l'azote libre à l'état de nitrate, du moins si c'est la cellulose qui sert de source de carbone, — bien une preuve de l'étonnante complication des actions biologiques dans le sol.

En 1885, Frank a fait voir que plusieurs arbres de nos bois, tels que le chêne, le hêtre, le charme, le pin commun et bien d'autres plantes et arbustes, entre autres la bruyère à balai, produisent des racines enveloppées d'un épais manteau de mycélium, qui dans certains cas pénètre même jusque dans l'intérieur des cellules des racines et que l'on ne peut pas considérer comme un parasite nuisible, mais plutôt comme un symbionte utile, avantageux et même indispensable pour la nutrition. On donne à cette association le nom de »mycorhize«. A vrai dire, cette découverte n'était pas nouvelle, car bien avant déjà on savait que les racines de divers saprophytes incolores de l'humus de nos bois de hêtre et de sapin, tels que *Monotropa hypopitys,* sont recouvertes de filaments mycéliens qui en traversent même les couches extérieures; mais la constatation du fait que ces mycorhizes sont universellement répandus était nouvelle, et dans la suite on en a trouvé bien d'autres exemples, et des plus surprenants, chez des groupes de plantes très différents.

Pour examiner de plus près les rapports entre ces organismes, nous trouvons des

sujets d'étude bien appropriés dans les premiers stades de développement de plusieurs de nos plus belles Orchidées de serre, telles que les genres *Cattleya, Laelia, Angraecum* et beaucoup d'autres. Ceux qui se sont occupés de la culture de ces plantes savent que parfois seurs graines germent facilement, mais que dans d'autres cas cette germination est excessivement difficile, sinon impossible. On crût y reconnaître l'influence de l'un ou l'autre microbe, qui n'existait pas partout, et qui devait pénétrer dans le jeune germe pour lui donner le pouvoir de continuer son développement. Cette supposition fut confirmée et l'on sait maintenant que l'organisme en question est le mycélium d'une moisissure.

Les graines et les plantules de *Cattleya mossiae* et de deux ou trois autres espèces, provenant de la magnifique collection d'Orchidées de Jhr. Ch. Smissaert à Apeldoorn, et fournies au Laboratoire de bactériologie à Delft, en divers stades de leur développement, par l'hortulanus M. Oversluys, ont permis de faire à ce sujet les constatations suivantes.

Les graines excessivement fines de la plante que je viens de citer se composent, comme celles de toutes les autres Orchidées, d'un embryon où l'on ne reconnaît ni bourgeon, ni racine embryonnaires, et dont le tégument, qui est en forme de poche et rempli d'air, tombe sitôt que la germination est en train.

Au commencement de la germination la graine se gonfle fortement et l'embryon indivis, qui ne se compose que de quelques cellules remplies d'albumine et d'huile, se colore légèrement en vert sous l'action d la lumière. Si le mycélium de la moisissure symbiotique fait défaut, la segmentation cellulaire et la croissance s'arrêtent là et les jeunes germes pâlissent et périssent au bout de peu de temps. Quand il est présent, au contraire, l'embryon continue à se développer et il se forme peu à peu un petit tubercule vert (*Pt*, fig. 9) où l'on reconnaît à la partie supérieure, quand il a atteint une grosseur d'un mm. environ, un bourgeon embryonnaire *Vg*, en même temps qu'une grosse racine *Ra* se fait jour, quelque part sur le côté, à travers une déchirure de l'écorce. Ce n'est qu'au bout de 8 à 12 années que la plante peut fleurir.

Dans les tubercules embryonnaires le mycélium se reconnaît aisément au microscope, et on peut le cultiver en transportant des plaques des tubercules sur un terrain de culture solide, qui ne contient que fort peu de substance organique soluble; tel est p. ex. de l'agar pur avec des traces de phosphate de potassium et de nitrate d'ammonium, où l'on voit s'étendre en tous sens ramifications excessivement grêles et caractéristiques de la moisissure.

Il est très intéressant de poursuivre les changements qui s'opèrent dans les graines de *Cattleya,* quand on les sème, avec et sans ce mycélium, sur la même plaque translucide d'agar; au bout d'environ trois semaines on constate déjà une grande différence, l'avantage étant pour les premières, et en même temps on voit que toutes les moisissures étrangères sont sans influence sur le processus de la germination ou lui sont même défavorables.

La manière dont le mycélium pénètre dans la racine peut s'observer aisément. Les filaments suivent de préférence les cellules du porte-embryon ou choisissent à cet effet les poils radicaux *Rp* qui se rencontrent ça et là, en groupes de 3 à 5 à la surface inférieure de l'embryon; il n'y a que quelques filaments qui traversent directement l'épiderme. Ce n'est que quand ils ont atteint des cellules relativement profondes que ces filaments continuent à se développer, en subissant des transformations que

l'on retrouve d'une façon à peu près identique chez beaucoup d'autres mycorhizes. On voit d'abord la cavité cellulaire se remplir presque tout entière de masses mycéliennes *(Mc)*, enroulées en pelote, qui donnent naissance, dans les cellules plus profondes, à des masses granuleuses compactes et brunâtres (*Tc*), ne ressemblant plus du tout à un mycélium. Comme l'examen microscopique a appris que ces masses sont consommées plus tard par la petite plante de *Cattleya* comme nourriture de réserve, nous pouvons donner aux cellules qui les contiennent le nom de »cellules nutritives«.

On n'a pas pu trouver de mycélium dans les autres parties de la plante. Par contre, dans les jeunes cellules voisines du sommet de la racine on observe des inclusions particulières, ressemblant fort aux granulations des cellules nutritives; mais on n'est pas parvenu à démontrer qu'il y a quelque rapport direct entre ces inclusions et le mycélium. Ces inclusions (*Ol*), que l'on trouve aussi dans d'autres jeunes organes des Orchidées, ont été décrites pour la première fois par M. Wakker, qui leur a donné le nom d'oléoplastes; il est à désirer que de nouvelles recherches soient entreprises à leur sujet, car elles ont indubitablement une grande importance dans le développement de ces végétaux.

Pour en revenir au mycélium, il y a lieu de se demander s'il est nourri par l'embryon, ou bien si c'est l'embryon qui est nourri par lui, ou encore si les deux éventualités sont réalisées à la fois.

Si l'on songe que diverses espèces d'Orchidées, dans les racines desquelles on trouve un mycélium qui n'est pas précisément le même que le symbionte de *Cattleya*, mais en est du moins très rapproché, appartiennent aux habitants incolores de l'humus, p. e. la *Neottia nidus avis* de notre flore, et que ces plantes enlèvent leur nourriture organique à l'humus du sol. sans aucun doute par le concours du symbionte, il est tout naturel de conclure que la fonction du mycélium de *Cattleya* doit être la même; la réponse à la question précédente sera donc que c'est le mycélium qui nourrit le germe.

Mais de quelle nature, se demandera-t-on, est la nourriture que le mycélium transporte vers l'embryon vert, qui de son côté, grâce à la chlorophylle, produira certainement lui-même une nourriture organique aux dépens de l'acide carbonique de l'air.

A ce propos, M. Stahl a prouvé que les plantes à mycorhize évaporent généralement peu d'eau; par le courant de transpiration elles n'enlèvent donc au sol que fort peu de nourriture minérale, et le petit nombre, voire même l'absence de poils radicaux est une circonstance qui y contribue. Le mycorhize doit donc avoir comme fonction importante de pourvoir la plante de sels inorganiques, et de rendre par là l'évaporation moins nécessaire.

Mais le pouvoir du symbionte de transformer en combinaisons ammoniacales les substances albuminoïdes qui sont répandues de tous côtés dans le sol environnant, et qui comme telles ne sont pas assimilables pour les plantes supérieures, a une importance beaucoup plus grande encore. Ces matières sont absorbées par le mycélium et y sont certainement transportées sur de grandes distances jusqu'à la plante à mycorhize même, qui reçoit ainsi la nourriture azotée nécessaire. Quelques auteurs ont cru devoir chercher l'utilité du symbionte dans une fixation d'azote libre, mais des recherches faites exprès m'ont appris que dans les mycélia de *Cattleya* et *Orchis* une telle fixation ne s'opère pas.

On pourrait encore se demander s'il y aurait quelque avantage pour certaines plantes supérieures, vertes, à pouvoir extraire du sol des substances organiques sans azote, alors même qu'elles sont en état d'en former elles-mêmes au moyen d'acide carbonique. Il semble qu'on doive répondre affirmativement à cette question, car on a pu s'assurer, par des expériences de cultures faites avec plusieurs espèces d'algues inférieures vertes, que ces organismes-là du moins se développent beaucoup plus rapidement quand ils se nourrissent avec une nourriture organique, comme le sucre, que lorsqu'ils doivent vivre de l'acide carbonique seul; on ne risque donc pas de se tromper quand on suppose qu'il en sera de même pour les plantes à mycorhize. Si le mycorhize a tant d'importance à plus d'un point de vue, il n'y a rien d'étonnant à ce que, dans le développement graduel du règne végétal, cette association ait pris naissance, dans plusieurs divisions indépendantes de ce règne, comme un organe destiné à la nutrition au moyen des substances organiques et inorganiques contenues dans le milieu environnant.

Dans ses »Leçons sur les phénomènes de la vie«, Claude Bernard a prononcé les mots mémorables suivants: »Le but de toute science, tant des êtres vivants que des corps bruts, peut se caractériser en deux mots: prévoir et agir«. Tel aussi doit être le but de la Microbiologie Agricole, de la jeune science encore dans sa période de formation, dont j'ai voulu vous donner, en quelques fragments, un aperçu rapide. Et s'il est vrai, comme il y en a beaucoup qui le soutiennent, que plus tard l'histoire de la civilisation qualifiera le 19e siècle de »siècle des microbes«, parce que c'est dans son cours que l'homme est parvenu à triompher des germes malfaisants des épidémies, on a toute raison de croire qu'à la fin du 20e siècle la microbiologie agricole, qui s'occupe spécialement des microbes utiles, aura aussi atteint son but et portera à son tour le cachet caractéristique: *prévoir et agir.*

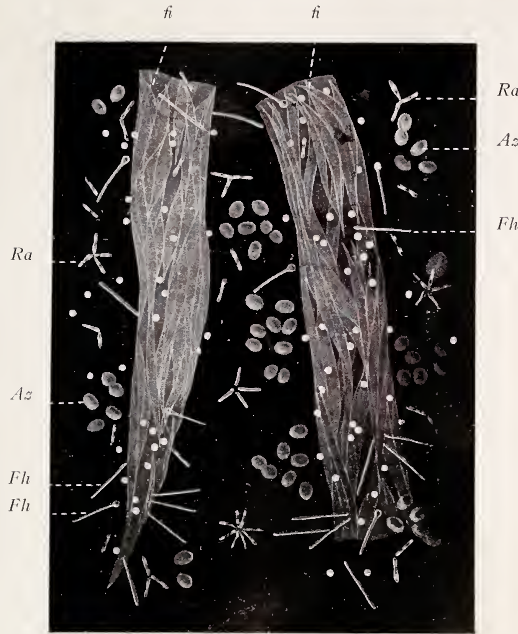


Fig. 2. (600). Fibres *fi* du lin, attaquées par les microbes actifs dans la fixation de l'azote libre qui les séparent en fibrilles élémentaires; *Fh* ferment hydrogénique; *Ra Bacillus radiobacter; Az Azatobacter chroococcum.*

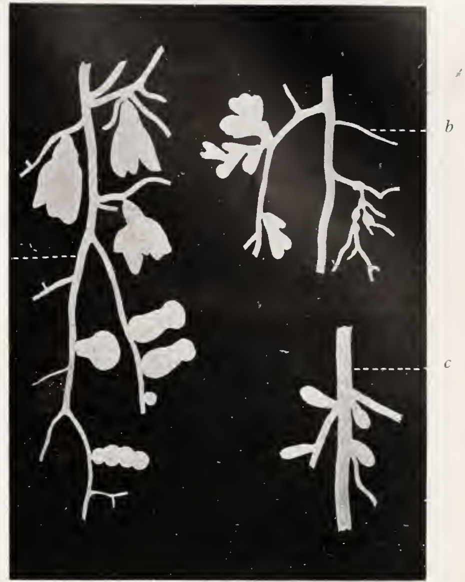


Fig. 3 (3). Types de tubercules de Papilionacées; *a* de *Robinia pseudo-acacia; b* de *Vicia cracca; c* de *Trifolium pratense.*

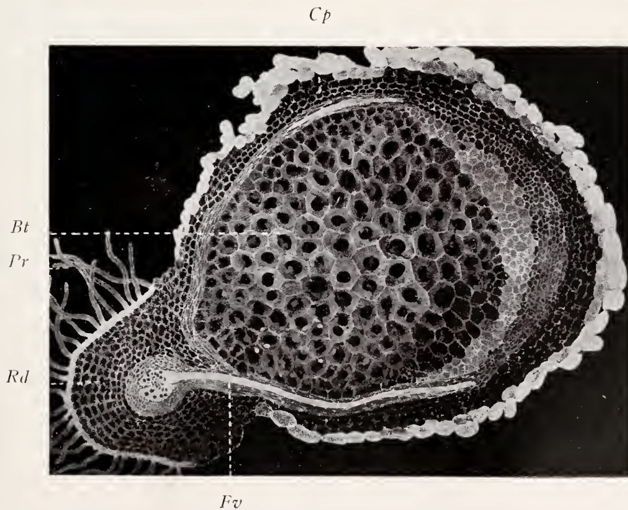


Fig. 4 (40). Coupe d'un tubercule de *Vicia faba; Rd* racine de la plante mère; *Pr* poils radicaux; *Bt* tissu à bactéroïdes du tubercule; *Cp* écorce; *Fv* faisceau vasculaire du tubercule.



Fig. 5.

Fig. 5 (400). Morceau d'un tubercule de *Vicia faba,* vu sous un plus fort grossissement; *Bt* cellules à bactéroïdes avec filaments du mucus bactérien *Mu; Cp* écorce du tubercule.

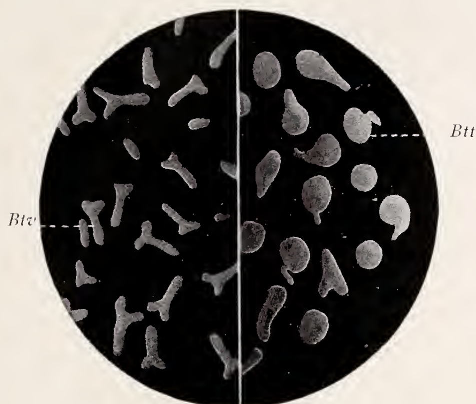


Fig. 6 (1000). *Btt* bactéroïdes du trèfle; *Btv* bactéroïdes de la vesce.

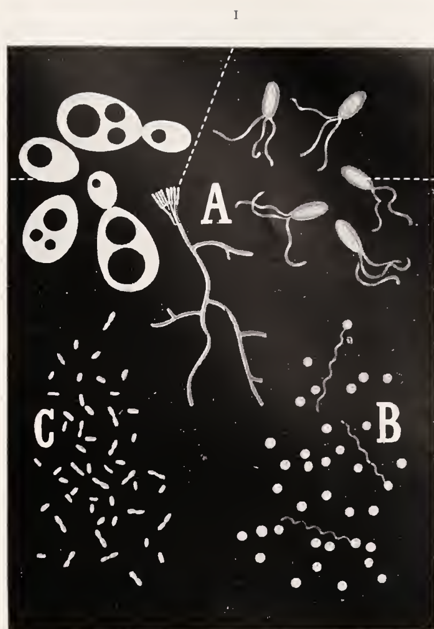


Fig. 8. A. Organismes qui forment de l'ammoniaque aux dépens des matières albuminoïdes 1 (25) Espèce de *Pénicillium*. 2. (1000) Levure rouge du sol. 3. (1000) *Bacillus fluorescens liquefaciens* avec cils.
B. (1500). Ferment des nitrites avec cils.
C. (1500). Ferment des nitrates.



Fig. 9 (50). Coupe d'un jeune embryon de *Cattleya mossiae; Pt* le prothalle avec les poils radicaux *Rp; Fl* la première feuille; *Vg* le point végétatif du bourgeon; *Ra* la première racine avec les oléoplastes *Ol; My* mycélium du symbionte; *Mc* les cellules à mycélium. *Tc* les cellules nutritives.



Fig. 7 (1000). Culture des bactéries *(Bacillus radicicola)* de *Vicia faba* dans une solution diluée de sucre de canne en décoction de feuilles de pois.

Sur l'excitation par traumatisme, le parasitisme et l'écoulement gommeux chez les Amygdalées.

Par M. W. BEIJERINCK et A. RANT.

Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome XI, 1906, p. 184—194. — Verscheen onder den titel »Wundreiz, Parasitismus und Gummifluss bei den Amygdaleen« in Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abteilung, XV. Band, 1905, S. 366—375.

Il y a déjà longtemps qu'on a reconnu [1]) qu'un hyphomycète, vivant en parasite dans l'écorce des Amygdalées, appelé *Coryneum beijerinckii* par M. Oudemans *(Hedwigia,* 5 sept. 1883, n°. 8), mais probablement identique à *Clasterosporium amygdalearum* Sacc. (= *Helminthosporium carpophilum* (Lév.) Aderh.), donne lieu à un écoulement de gomme abondant et persistant, quand on l'inocule dans le cambium de ces arbres.

Au commencement, on a émis de divers côtés des doutes sur l'exactitude de cette observation, qui a été confirmée d'autre part. Actuellement il ne saurait plus régner de l'incertitude à ce sujet; la preuve en a été fournie au moyen des cultures pures [2]) du champignon en question. Ce sont particulièrement les recherches détaillées de M. Aderhold [3]) qui ont étendu à plus d'un point de vue notre connaissance du phénomène de la gommose parasitaire.

Mais, dans toutes les recherches antérieures, on n'a pas assez fait attention au rapport qui existe entre l'écoulement gommeux et l'excitation produite par une blessure, ni à celui entre cette excitation et le parasitisme; voilà comment il se fait qu'une théorie satisfaisante du processus manque encore complètement. Les nouvelles expériences, que j'ai entreprises avec le concours de M. A. Rant, dans le but de faire la lumière sur ce côté de la question, ont permis de se faire une meilleure idée de la relation entre ces phénomènes, dont les pages suivantes donnent un aperçu préliminaire, et qui sera traitée plus en détail à une autre occasion.

---

[1]) M. W. Beijerinck, Maladie de la gomme chez les plantes; ces *Archives*, 19, 1886.

[2]) Les cultures pures sont d'une préparation bien plus difficile qu'on ne l'attendrait d'un champignon, dont la croissance est aussi vigoureuse. Il est recommandable de se servir d'une décoction de feuilles de pêcher dans de l'agar à peptone, ou de l'agar à moût dilué, et on obtient alors, soit une forme très virulente, très sporulante, ou une forme peu virulente, avec peu de spores, ou même un mycélium stérile, qui se comporte comme saprophyte, ou du moins comme un faible parasite. Depuis 1886 j'ai fait de nombreuses expériences avec de pareilles cultures pures.

[3]) Ueber *Clasterosporium carpophilum* (Lév.) Aderh. und dessen Beziehungen zum Gummifluss. *Arbeiten der Biolog. Abteil. des Gesundheitsamtes*, Bd. II, 1902, Heft 5, p. 515.

Comme objets d'expérience nous nous sommes surtout servis du pêcher et du pêcher-amandier [1]), parce que ces espèces sont très sensibles à des lésions et y réagissent aisément par un écoulement de gomme. Le cerisier, le prunier et l'abricotier ne donnent pas aussi facilement de la gomme quand on les blesse, mais présentent d'ailleurs des phénomènes identiques.

Nous communiquerons d'abord les observations faites sur des tiges très jeunes, encore vertes, puis celles sur des tiges plus âgées, présentant un ou plusieurs anneaux totalement lignifiés.

1. *Lésion du cambium de jeunes rameaux verts.*

Quand en plein été on blesse jusque dans le cambium et le bois secondaire de jeunes pousses du pêcher ou du pêcher-amandier, on constate qu'en moins d'une semaine, parfois même en 4 jours, des gouttelettes de gomme apparaissent sur quelques blessures. Près du sommet de la pousse l'écoulement gommeux est faible; puis vient une zône, longue de 1 à 2 décimètres, où le phénomène est le plus intense; plus bas encore il diminue de nouveau, et il finit par disparaître complètement quand on s'éloigne davantage du sommet. La région la plus sensible est donc celle qui est située au-dessous et tout près de la zône du maximum de croissance longitudinale, mais ce n'est pas cette zône elle-même. La raison pour laquelle elle ne se confond pas avec cette zône, c'est sans doute que l'écoulement gommeux est en rapport avec la croissance en épaisseur cambiale, aussi bien celle du cambium que celle du procambium; or, dans les parties qui s'allongent encore cette croissance est faible, et les autres tissus parenchymateux sont incapables de se transformer en gomme. Cette circonstance est d'une importance capitale pour l'explication du phénomène.

Il importe aussi de remarquer le fait que, quand on fait l'expérience sous la forme considérée ici, les portions du rameau déjà recouvertes d'une couche subéreuse ne présentent pas non plus d'écoulement gommeux, quand en été on les blesse au cambium. Mais je montrerai tantôt qu'il n'en est pas ainsi en toutes circonstances, et que cela dépend notamment de la saison; on doit donc conclure que c'est l'état physiologique dans lequel se trouve le tissu qui détermine la possibilité ou l'impossibilité de la formation de la gomme.

L'examen microscopique des blessures où se forme de la gomme a appris, que cette substance sort de fins canaux qui se trouvent à l'intérieur de l'anneau de cambium, qu'ils touchent directement par la face extérieure. Au point de vue anatomique cette gomme correspond donc à l'aubier secondaire, qui s'est arrêté dans son développement et est devenu fluide quand il était encore à l'état cambial ou cellulaire. La formation de canaux séparés résulte du fait, que les cellules du cambium des rayons médullaires se transforment bien plus difficilement en gomme que le jeune bois entre ces rayons. Cependant la gommose peut finir par affecter aussi les rayons médullaires en voie de formation, et il se forme alors des cavités gummifères plates ou des canaux elliptiques larges. Les cellules et faisceaux de cellules trichomatiques, bien connues et souvent figurées, qui pénètrent dans les canaux gummifères, proviennent d'ordinaire de la transformation du jeune cambium des rayons médullaires.

---

[1]) *Amygdalus amygdalo-persica;* Duhamel Dumonceau, Arbres fruitiers, Tab. 4; Grenier et Godron, Flore de France, T. I, 1848, p. 512.

La situation et l'extension des canaux gummifères sont étroitement liées à la localisation et l'importance de la blessure. Quand la lésion est faible, on ne trouve les canaux que dans son voisinage immédiat; ce n'est que quand la blessure est pénétrante et atteint la moëlle des rameaux que les canaux se forment sur tout son pourtour. Les canaux atteignent une longueur de 1 à 10 mm.; leurs extrémités sont situées à peu près sur une ellipse, dont la blessure occupe le foyer inférieur (c. a. d. tourné vers la base du rameau). Ainsi donc l'excitation traumatique peut s'observer un peu plus loin vers le haut que vers le bas de la blessure, et latéralement elle s'étend encore moins loin que dans le sens longitudinal. Quand la lésion offre peu d'étendue, p. ex. quand on a pratiqué une petite incision transversale ou simplement une piqûre, on observe, d'accord avec ce qui précède, que les canaux les plus larges sont au centre et que latéralement ils deviennent d'autant plus étroits qu'ils sont plus éloignés de la blessure.

Résumant ce qui précède, nous arrivons à cette conclusion, que la gomme traumatique, qui se forme en été dans les jeunes rameaux verts, sous l'influence d'une excitation s'étendant elliptiquement autour de la blessure, se forme aux dépens de l'aubier en voie de développement, tandis que tous les autres tissus, dont le développement est plus avancé ou achevé, quelles que soient leur nature et leur situation, ne sont pas affectés par l'écoulement gommeux. En un mot, le phénomène repose sur une transformation patholique du tissu ligneux embryonnaire, causé par une excitation traumatique.

2. *Lésion du cambium de branches plus âgées.*

Quand on coupe aux mois de février et mars des branches, âgées d'un an ou plus âgées encore, d'un pêcher-amandier, d'un abricotier, d'un cerisier ou d'un prunier, et qu'on les place avec leurs bases dans l'eau dans une chambre chauffée, on observe au bout de 5 à 10 jours que toutes les branches saines et vigoureuses, sans exception, laissent suinter de la gomme par l'anneau cambial de la section. Des coupures que l'on pratique à cette époque dans de pareils rameaux, traversant l'écorce et pénétrant jusque dans le cambium, présentent le même écoulement, qui est sourtout sensible quand la section est oblique ou transversale, tandis qu'il l'est moins quand la plaie est longitudinale.

Des blessures analogues, faites à l'air libre dans cette saison, ne donnent pas lieu à un écoulement gommeux, sans doute parce que la température est trop basse pour rendre possible les processus biochimiques nécessaires au phénomène. D'autre part, ces mêmes branches, quand on les blesse de la même façon en été, ne réagissent pas par un écoulement de gomme, pas plus quand on les conserve dans l'eau dans une chambre que quand on les laisse sur l'arbre. Il en résulte clairement que c'est surtout de l'état particulier du cambium au printemps que dépend la formation de la gomme. Mais il n'en est plus ainsi quand la plaie est infectée par *Coryneum,* qui excite toujours à une production de gomme abondante.

Quand on examine au mois de février l'anneau cambial au voisinage d'une section d'où coule la gomme, on observe ce qui suit:

On constate en premier lieu qu'en cette saison le »cambium« se compose de plusieurs couches et non d'une couche unique de cellules. Dans tous les cas, le con-

traste entre l'écorce et le bois n'est pas fort marqué dans ce tissu cellulaire, et il est impossible d'indiquer où s'établira la limite entre les deux. Mais ce qui est particulièrement intéressant, c'est la formation de canaux gummifères dans ce manteau cambial, composé de plusieurs (4 à 6) couches de cellules, dans le voisinage, et même jusqu'à une distance considérable des portions lésées, d'une façon qui est tout à fait la même que nous l'avons décrit tantôt pour les jeunes rameaux verts. Il est vrai que, vu le manque de différenciation dans le cambium, et l'inactivité de la croissance en épaisseur, leur origine dans la partie qui correspond à l'aubier, et non à l'écorce secondaire, est difficile à établir et exige un examen minutieux et poursuivi du développement du bois. Mais on arrive à la conclusion certaine, que la gomme se forme, dans ce cas aussi, aux dépens du bois embryonnaire.

Dans cette épreuve en chambre avec des branches âgées, l'extension et la disposition des canaux gummifères sont plus nettes et d'un examen plus facile que pour les jeunes rameaux. C'est au milieu de leur longueur que ces canaux ont la plus grande largeur, et leurs extrémités sont étroites; les canaux du milieu, c. à d. ceux qui sont les plus rapprochés de la blessure, sont les plus volumineux. Ici aussi les canaux aboutissent à l'intérieur d'une ellipse, dont la plaie occupe à peu près le foyer inférieur. On reconnaît donc facilement que l'excitation se propage plus loin dans le sens du sommet que vers la base de la pousse; une circonstance que l'on pourrait expliquer en admettant que l'excitation se propage dans le xylème avec la »sève ascendante.« L'observation de M. Aderhold, que l'infection par *Coryneum* de blessures faites au-dessus d'un »anneau« sans écorce, dans un rameau annelé par incision, donne lieu à un écoulement gommeux beaucoup plus fort qu'au-dessous de l'anneau, n'est pas en désaccord avec cette supposition, puisque la »sève descendante« apporte au-dessus de l'anneau les aliments, dont *Coryneum* a besoin pour se développer et qui manquent bientôt au-dessous de l'anneau.

Des deux côtés d'une blessure latérale, les canaux s'étendent d'autant plus loin que la lésion est plus profonde et plus étendue; il est donc possible de transformer en un système de canaux gummifères, par des incisions profondes, l'anneau cambial presque tout entier, tout comme pour les sections transversales. Ici comme pour des rameaux verts, le cambium des rayons médullaires produit bien plus difficilement de la gomme que les portions interradiales, qui produisent plus tard le vrai bois. Pourtant, quand l'excitation traumatique est très énergique, le cambium des rayons médullaires se liquéfie également, et les canaux communiquent alors latéralement en donnant naissance à des cavités plates.

En résumé, nous arrivons pour les branches âgées aux mêmes conclusions que pour les jeunes pousses: l'écoulement gommeux est dû à une liquéfaction de l'aubier embryonnaire, produite par excitation traumatique.

Le fait bien connu, que l'on observe souvent (mais pas toujours) chez les Amygdalées, dans le bois de tout âge, des cavités et des canaux gummifères, s'accorde parfaitemenent avec ce qui précède, quand on admet que les canaux du vieux bois, éloignés du cambium, se sont formés il y a longtemps déjà, quand la région dévastée était encore à l'état embryonnaire. *Le bois complètement formé ne se liquéfie jamais.* Il résulte encore de ce qui précède, que le cambium n'est pas détruit par le processus, car, en dehors des cavités à gomme, il a formé régulièrement les anneaux ligneux annuels.

Quelle est la dimension que peut atteindre un canal gummifère, et comment il se fait que la même couche de cambium forme alternativement du bois et de la gomme, sous l'influence d'une excitation traumatique persistante, comme dans le cas d'infection par *Coryneum*, voilà des questions non encore résolues.

3. *Excitation produite par des poisons ou par brûlure.*

Bien que nous ne sachions pas pour le moment ce qu'on doit entendre par excitation traumatique, il est cependant à supposer qu'il s'agit d'une influence des cellules mourantes, nécrobiotiques, sur les cellules cambiales vivantes. On peut donc s'attendre à ce que des poisons violents, introduits dans le cambium, agissent d'une manière analogue, et peut-être bien plus énergique encore, qu'une simple blessure, puisque la diffusion du poison peut entraîner la mort d'un nombre plus grand de cellules successives. Il était d'ailleurs probable que des lésions par brûlure se comporteraient de même, quoique plus faiblement que de forts poisons. Cette supposition a été reconnue exacte.

Je me suis servi comme poison de sublimé corrosif, et en été j'ai obtenu avec cette substance des résultats décisifs déjà au bout de 4 à 7 jours; des piqûres faites dans de jeunes rameaux verts de pêcher, et infectées par ce poison, donnaient beaucoup plus de gomme qu'on n'aurait pu l'attendre de simples piqûres. Puisque le sublimé est un poison mortel pour les champignons, le traitement par cette substance excluait toute possibilité que la cause immédiate de la gommose fût la présence d'une bactérie parasite, p. ex. une bactérie mucogène non cultivable; la gomme n'est donc pas un mucus bactérien, ainsi que le prétendent quelques auteurs peu experts. Le fort écoulement gommeux produit par le champignon *Coryneum* s'explique par le fait qu'il engendre un poison violent, agissant comme le sublimé, et qui produit une excitation traumatique de longue durée.

La circonstance, que les plaies infectées par le sublimé se résolvent en gomme, même chez les parties âgées des branches et à une époque où la lésion seule ne donnerait lieu à aucun écoulement, est d'accord avec l'action particulièrement intense de ce poison. C'est ainsi qu'au mois de juillet des rameaux d'abricotier assez vieux ont fourni beaucoup de gomme par des blessures traitées au sublimé, alors qu'en cette saison les mêmes blessures guérissent aisément, quand elles ne sont pas empoisonnées, par formation d'un cal, mais sans produire de la gomme.

Les lésions par brûlure ont donné le même résultat, quoique moins marqué; ce qui est facile à comprendre, puisque le sublimé, en pénétrant lentement par diffusion dans les tissus mourants, détruit pendant longtemps de nouvelles cellules, de plus en plus éloignées de la blessure. Pour les brûlures au contraire, que j'ai provoquées au soleil au moyen d'une loupe, le champ atteint est et reste limité. Il est évident qu'au centre d'un pareil champ on trouve des cellules mortes, entourées d'une zône de cellules nécrobiotiques, ces dernières ayant ceci de caractéristique, que leur protoplasme est mort, tandis que les enzymes ou autres substances enzymateuses ont conservé leur activité. Particulièrement dans ce cas la conclusion semble inévitable, que l'influence de ces derniers corps, c. à d. des substances nécrobiotiques, sur les cellules vivantes qui les environnent est la cause de l'écoulement gommeux.

Cette manière de voir nous fait supposer qu'il y a quelque analogie entre la

transformation du bois embryonnaire en gomme et l'action des enzymes cytolytiques, rappelant la »cytase« des physiologistes, qui peut dissoudre des cellules entières, et non la même notion chez les botanistes, par laquelle ils ont en vue la liquéfaction de la paroi cellulaire seulement, et pour laquelle les noms plus spéciaux de cellulase, gélase et pectosinase conviennent mieux.

L'hypothèse émise en 1886 (l. c.), que la substance enzymateuse, engendrant la gomme, proviendrait du champignon *Coryneum*, s'écarte de la manière de voir actuelle, en ce sens que l'on peut maintenant considérer comme démontré, que l'action excitante du champignon repose sur un poison, et que ce sont les cellules végétales nécrobiotiques elles-mêmes qui secrètent l'agent de la gommose.

Cet agent quitte sans doute les cellules et agit sur les cellules environnantes jusqu'à une certaine distance; c'est ce qu'on peut conclure du fait, que la gomme ne provient pas exclusivement des cellules de la plante, mais peut, dans le cas d'une infection par *Coryneum*, être formée en partie par la transformation des cellules mycéliennes du champignon lui-même, ainsi que je l'ai représenté dans mon mémoire de 1886. J'y ajouterai encore que l'étude des cultures pures a démontré, que ces cellules mycéliennes, qui ont la propriété de se transformer, ne se rencontrent que dans les plaies gummipares des Amygdalées et ne se forment jamais dans les cultures sur un autre terrain que le bois vivant.

L'hypothèse que les enzymes cytolytiques, provenant des cellules nécrobiotiques, seraient la cause de la maladie de la gomme, se trouve corroborée indirectement par le fait que, chez les plantes supérieures, on constate l'activité d'un corps cytolytique, lors de la formation des trachéides et des vaisseaux dans le méristème cellulaire ou dans le procambium. Ici la transformation repose indubitablement sur une cytolyse, dans laquelle les parois longitudinales lignifiées des éléments atteints restent seules intactes, tandis que les matières produites par la cytolyse consistent, au moins partiellement, en corps de nature gommeuse, que l'on peut retrouver dans les vaisseaux.

Suivant notre manière de voir, l'excitation traumatique ne ferait donc qu'activer un processus qui se produit déjà dans la vie normale, et notamment, puisque l'écoulement gommeux n'est réellement important que dans l'aubier secondaire, précisément là où la cytolyse physiologique doit être certainement la plus forte dans les conditions normales.

La gomme que l'on trouve dans beaucoup d'espèces de bois se laisse donc ranger sans difficulté dans le même ordre de phénomènes. En effet, si notre hypothèse est exacte, il faut que la gomme qui se produit dans la formation normale des vaisseaux soit résorbée dans les circonstances ordinaires; mais il n'y a pas lieu de s'étonner que cette résorption n'est pas toujours complète, et que bien souvent une partie de la gomme échappe à cette résorption et se retrouve alors, comme produit physiologique, même dans les vaisseaux complètement développés.

Voici comment nous pouvons résumer provisoirement, d'après ce qui précède, la théorie de l'écoulement gommeux:

1. La plante normale engendre des substances cytolytiques, qui contribuent à la formation des vaisseaux et des trachéides.

2. La gomme physiologique qui se forme par leur action est ordinairement résorbée, mais dans certaines circonstances on peut encore la retrouver comme telle dans le creux des vaisseaux mûrs.

3. L'écoulement gommeux repose sur une activité excessive de pareilles substances cytolitiques, engendrées par les cellules nécrobiotiques, la nécrobiose signifiant la fonction cellulaire qui subsiste après la mort du protoplasme, les substances enzymateuses ayant conservé leur activité.

4. Les poisons, comme le sublimé corrosif ou le poison produit par *Coryneum*, augmenteraient donc indirectement la cytolyse dans le cambium et dans l'aubier qui en résulte.

Il est clair que, dans cette théorie, deux processus peut-être tout à fait différents, savoir la cytolyse et la lignification, n'ont pas été suffisamment séparés. Mais la possibilité que les corps qui participent à la lignification, comme la vanilline, le méthylfurfurol, la pyrocatéchine etc., prennent également part à la cytolyse, rend infructueuse pour le moment toute spéculation relative à ce sujet.

4. *Influence de saprophytes sur l'excitation traumatique et l'écoulement de gomme chez de jeunes rameaux verts. Parasitisme.*

Nous avons vu tantôt que dans les expériences de traumatisme, faites sur de jeunes rameaux en juillet, ces rameaux n'étaient capables de produire de la gomme que sur une faible longueur; les parties relativement âgées ne produisent pas de gomme en été, mais leurs blessures guérissent rapidement et radicalement par formation d'un cal.

En comparant entre eux plusieurs des rameaux ainsi blessés, on constate une différence notable quant à la longueur de la zône, où se trouvent les blessures présentant l'écoulement gommeux; cette zône peut notamment être plus courte que 1 décimètre, mais elle en peut aussi dépasser deux.

Voici quelle semble être l'explication de ce phénomène important:

D'après notre manière de voir, l'écoulement gommeux est la conséquence directe d'un processus nécrobiotique; toutes les causes qui produisent la nécrobiose donnent donc lieu à cet écoulement. Or, si de simples blessures suffisent déjà à la produire dans des conditions déterminées, d'autres circonstances aussi, entraînant la mort des cellules, doivent avoir la même conséquence. Pour ce qui regarde les saprophytes, c. à d. les microbes qui, sans engendrer des poisons specifiques, vivent des sucs végétaux ou se développent dans ces liquides, ces organismes doivent, quand ils se multiplient outre mesure, entraîner la mort des cellules voisines de leur hôte en empêchant l'accès de l'oxygène, et occasionner ainsi une augmentation de l'excitation traumatique, quand ils sont introduits dans des blessures. Si cette idée est exacte, on peut s'attendre à ce qu'une jeune pousse portant des saprophytes offre des blessures produisant de la gomme en nombre plus grand que d'autres qui n'en portent pas. Pour mettre cette supposition à l'épreuve, j'ai pris des rameaux tout à fait semblables, et je les ai blessés d'une façon identique; chez quelques-uns d'entr'eux j'ai introduit *Dematium pullulans* dans la blessure. Ce champignon est un véritable saprophyte des Amygdalées et il se trouve très souvent, sans qu'on s'en aperçoive, sur des feuilles tendres, mais saines, sur des rameaux et surtout sur de jeunes fruits; mais il n'est pas assez répandu pour infecter toute blessure obtenue par une simple lésion. Ma prévision a été pleinement confirmée: le jeune rameau vert, artificiellement infecté par le champignon, portait des blessures présentant la gommose jusqu'à une distance du sommet

bien plus grande que le rameau non infecté. Mais les portions âgées de la pousse possèdent l'immunité à l'égard de ces saprophytes, ce qui fait que des plaies infectées, faites dans des branches âgées de deux ou plusieurs années, guérissent normalement, sans donner de la gomme; donc tout autrement, comme on voit, que dans les cas d'infection par *Coryneum.*

J'ai obtenu un résultat analogue au moyen d'un saprophyte que j'ai isolé et déterminé comme *Phyllosticta persicae.* Avec des bactéries isolées de la gomme je n'ai pas réussi à produire le même phénomène; j'ai reconnu qu'ils étaient absolument inactifs, probablement parce qu'ils ne pouvaient pas se développer suffisamment dans les sucs des cellules tuées par la lésion, pour produire l'asphyxie des cellules non atteintes, en empêchant complètement l'accès de l'oxygène. Mais on trouvera certainement d'autres espèces de bactéries, qui se comporteront comme les saprophytes dont je viens de parler [1]).

Je profiterai de cette occasion pour faire quelques remarques sur la flore saprophytique normale des plantes supérieures en général.

MM. Burri et Düggeli sont d'avis que c'est une espèce déterminée de bactéries, qu'ils ont appelée *Bacillus herbicola* [2]), qui est non seulement le principal représentant, mais pour ainsi dire l'unique représentant de cette flore. Bien que j'accordeque cette bactérie [3]), que j'ai moi-même découverte, il y a déjà plusieurs années, et que j'ai appelée *B. anglomerans* [4]), est universellement répandue, des recherches étendues m'ont cependant appris qu'il y a encore d'autres microbes qui jouent un rôle important comme saprophytes normaux.

Pour ce qui regarde en premier lieu la manière dont se présente le *B. anglomerans (= B. herbicola)* et sa répartition, je recommande le procédé suivant pour découvrir cette espèce: on n'a qu'à laisser germer une graine (le trèfle, le froment, le chanvre, le lin, *Brassica, Vicia, Phalaris* et bien d'autres semences encore ont été employés) sur un morceau de papier buvard humide, placé dans un thermostat de 25 à 30° C. Dès que la racine de l'embryon apparaît, plusieurs cellules de la calyptra sont déjà écorchées, et, dans la masse mucilagineuse ainsi formée, notre bactérie ne manque presque jamais de se développer, puisqu'elle supporte bien l'exsiccation et qu'elle existe toujours dans la poussière qui couvre l'enveloppe de la graine. On n'a donc rien d'autre à faire, qu'à saisir au moyen d'une pincette les graines qui ont germé, et à tracer au moyen de l'extrémité de la racine des traits inoculatoires sur la surface d'une plaque de gélatine appropriée, p. ex. au bouillon de viande. Au bout

---

[1]) Cette prévision a déjà été confirmée par des recherches récentes de MM. Aderhold et Ruhland, *Centralbl. f. Bakteriologie.* Bd. 15, pag. 376, 1905.

[2]) Die Bakterienflora gesunder Samen und Keimpflanzen *(Centralbl. f. Bakt.,* Abt. II, Bd. XII, 1904, p. 602),

[3]) L'histoire de cette bactérie prouve d'une façon caractéristique que la détermination des espèces bactériennes, même les plus vulgaires, n'est pas de la compétence de tout le monde. La présence de cette bactérie sur les racines de toute espèce de plantes a conduit Frank à leur attribuer la formation des tubercules des Papilionacées, ainsi qu'il résulte clairement de sa fig. 34, Pl. I des *Landwirtschaftl. Jahrb.* 1890. Son *Rhizobium leguminosarum* n'est donc pas autre chose que mon *B. anglomerans* ou que le *B. herbicola* de MM. Burri et Dügelli, et il n'a absolument rien à voir dans les tubercules des Papilionacées.

[4]) *Botanische Zeitung*; 1888, p. 749.

de 1 à 2 jours on obtient ainsi des séries entières de colonies, parfois constituées exclusivement par le *B. anglomerans,* d'autres fois mélangées d'autres bactéries communes. L'espèce en question se reconnaît aisément aux zooglées très caractéristiques (qui se rencontrent pourtant sous la même forme chez d'autres espèces encore), et le plus souvent aussi à la couleur jaune ou brun clair des colonies; mais ces dernières ne sont pas rarement incolores, ce qui rend le diagnostic un peu plus difficile.

Tandis que M. Düggeli prétend que *B. herbicola* se rencontre aussi en grandes quantités sur les feuilles de toute espèce de plantes, mes propres recherches m'ont donné la conviction, que cela n'est pas rare, il est vrai, mais que leur existence sur les feuilles est loin d'être aussi générale que dans le mucus de la calyptra des sommets des racines. En outre, la véritable flore saprophytique, du moins celle des feuilles des arbres, que j'ai étudiée spécialement, consiste principalement en de tout autres microbes, notamment des Dématies, des Blastomycètes, parmi lesquels on doit ranger les levures rouges et incolores du sol, et certaines moisissures très communes, appartenant aux genres *Trichosporium, Cladosporium* et *Epicoccum* [1]): par contre, les bactéries ne s'y présentent que rarement et quantités considérables, et je m'étonne que MM. Burri et Düggeli n'aient pas remarqué ce fait pourtant très évident. Ce sont surtout les Dématies qui, en plusieurs espèces, constituent la majeure partie de cette flore, et c'est précisément pour cela que je me suis servi, pour mes expériences d'infection de blessures cambiales, d'une espèce de ces microbes fort répandue sur les Amygdalées. Le fait, que les Dématies se rencontrent comme véritables saprophytes dans l'écorce de branches mortes de diverses Amygdalées, ne diminue en rien leur importance au point de vue de la »flore normale« des plantes, car il est évident que les microbes de cette flore doivent trouver, sur les feuilles tout à fait saines, l'une ou l'autre nourriture par laquelle ils deviennent des saprophytes [2]), et qu'ils pourront se nourrir encore mieux dans les cellules mortes de leur hôte.

Pour notre but, il semble inutile de pénétrer plus avant dans les nombreuses questions qui se présentent ici, et qui sont encore loin d'être épuisées; revenons donc à la maladie de la gomme.

Pour ce qui regarde maintenant les parasites proprement dits, qui provoquent l'écoulement gommeux, nous n'avons pu découvrir, en dehors du *Coryneum* particulièrement actif, que *Monilia fructigena* sur des rameaux d'abricotier et aussi, mais avec bien moins de certitude, une *Cytospora* fort répandue sur les branches de ceri-

---

[1]) De nombreuses expériences, faites avec des végétaux qui étaient absolument dépourvus de pucerons, ont prouvé qu'en général il ne s'agit pas ici d'un développement dans le miellat formé par ces insectes.

[2]) Il faut évidemment que cette nourriture soit absorbée à l'état dissous. Il est probable que cette absorption n'a lieu que par un temps pluvieux, et non par un échange osmotique entre les cellules du microbe et de la plante. En faveur de cette manière de voir on peut citer le fait, que les plantes qui ne sont pas humectées par la pluie (comme *Robinia, Crambe, Hypericum* etc.) ne portent qu'un nombre relativement restreint de germes, tandis que les feuilles que la pluie mouille, telles que celles de *Sambucus, Ulmus, Fraxinus,* du pêcher, du prunier etc., représentent le cas ordinaire, où les feuilles sont pour ainsi dire couvertes de germes. Ce fait nous fait comprendre la signification biologique du revêtement cireux *(fleur* ou *pruine)* qui recouvre les feuilles des plantes non mouillables, comme moyen d'éviter le dépôt de germes de microbes en général et de parasites en particulier.

sier. Il est vrai qu'avec cette dernière espèce nous n'avons pu produire d'écoulement gommeux ni chez le pêcher, ni chez le cerisier, mais nous avons eu plus de succès en infectant fortement le prunier avec ce parasite [1]).

Ce qu'il y a de caractéristique dans l'action du parasitisme en général, c'est la grande intensité des phénomènes d'empoisonnement, observés dans les blessures infectées et dans leur voisinage; ces phénomènes sont si intenses, que de jeunes rameaux, dans le cambium desquels on a introduit *Coryneum,* périssent aisément sur toute leur longueur, pendant que les tissus deviennent bruns, et alors c'est seulement de la zône de transition entre les tissus morts et vivants que découle la gomme. En infectant avec précaution, p. ex. de petits piqûres, on peut facilement conserver le rameau vivant et obtenir un écoulement de gomme par toutes les blessures. Partout où il y a du cambium, on peut provoquer en toute saison, au moyen de *Coryneum,* un écoulement abondant de gomme chez toutes les Amygdalées examinées; au point de vue anatomique, on observe alors les mêmes phénomènes que l'on obtient par une simple blessure ou par empoisonnement par le sublimé, mais à un degré beaucoup plus fort, et c'est encore une fois la formation, dans la région cambiale, de canaux gummifères que l'on retrouve plus tard dans le bois secondaire, qui est ce qu'il y a de plus frappant.

5. *Comparaison de l'écoulement gommeux avec l'écoulement de gomme-résine.*

L'écoulement de gomme chez les Amygdalées, comme conséquence d'une excitation par traumatisme, n'est pas du tout un phénomène isolé; au contraire, jusque dans les détails anatomiques, il est identique à des cas bien étudiés d'écoulement de gomme-résine chez les Dicotylées, où l'on a même observé avec certitude un mycélium parasitaire, que l'on n'a toutefois pas exactement interprêté. Pour l'écoulement de gomme-résine on a deux cas à considérer. Ou bien il n'y a pas de canaux résinifères dans la plante saine, et ces canaux ne prennent naissance que par suite d'une excitation traumatique *(Styrax benzoin),* tout comme chez les Amygdalées, ou bien la plante normale contient déjà de pareils canaux (*Canarium, Shorrea, Tolnifera*). Mais M. Svendsen [2]) a clairement démontré pour ce dernier cas que les canaux normaux n'ont rien à voir dans la formation de la gomme-résine pathologique, qui découle de nouveaux canaux, formés, par suite de la lésion, dans la région cambiale, d'accord avec ce qui s'observe chez *Styrax benzoin* aussi bien que chez les Amygdalées.

Ce mode de formation des canaux gommeux n'est d'ailleurs pas seulement la règle pour la gomme et la gomme-résine, mais encore pour la résine traumatique elle-même, comme l'a démontré M. Tsirch [3]).

Il résulte des descriptions anatomiques de ces auteurs, que le produit pathologi-

---

[1]) De nombreux essais pour produire, sous l'influence d'un poison ou de parasites, un écoulement de gomme chez *Elaeagnus argentea* ont été infructueux.

[2]) Svendsen, Harzfluss bei den Dikotylen *(Archiv for Mathematik og Naturvidenskab af* Helland, Sars, Torup, 26, 1, 1905). Dans ce travail sont décrites les préparations faites par M. le Prof. Treub à Buitenzorg. On y trouve aussi la bibliographie.

[3]) Ueber den Harzfluss. *Flora* Bd. 93, p. 180, 1904.

que dérive partout de la liquéfaction du jeune bois secondaire embryonnaire, de sorte que la gommose aussi bien que l'écoulement de gomme-résine et de résine proprement dite doivent être considérés invariablement comme des troubles pathologiques dans le processus de la lignification.

La comparaison est rendue encore remarquable par le fait que, dans tous les cas, le parasitisme semble jouer le même rôle, c. à d. qu'en prolongeant une excitation traumatique il active l'écoulement de résine et de gomme-résine de la même manière que la gommose.

L'exactitude de cette assertion a déjà été établie expérimentalement pour la gomme damar, de l'île d'Obi près de Célèbes, ce qui résulte d'un rapport sur cette substance, soumis au Gouvernement Hollandais par le forestier en chef M. S. P. Ham, et dont l'auteur a eu l'obligeance de me procurer une copie. M. Ham a constaté que cette gomme-résine, produite par une *Diptérocarpée* (suivant Boerlage une espèce de *Hopea* non encore décrite), coule beaucoup plus abondamment et régulièrement quand on infecte au préalable les blessures par des morceaux de la même gomme.

Les échantillons employés pour l'infection contenaient, sans aucun doute, le mycélium ou des spores d'un parasite, et il est évident qu'il s'ouvre ici pour la botanique pratique un vaste champ d'étude des moyens pour obtenir, d'une façon plus rationelle et en plus grande quantité, les substances précieuses considerées ici. Dans ces recherches il s'agira en premier lieu d'obtenir en cultures pures les parasites actifs, et ensuite on devra examiner quelle est la meilleure méthode pour infecter, au moyen de ces organismes, des blessures artificielles. Avec *Coryneum* on obtient fort simplement une infection générale de plusieurs blessures, en arrosant les branches lésées, ou même les arbres entiers, d'une eau contenant les spores. L'eau et les spores pénètrent aisément par capillarité dans les piqûres et les incisions, que dans ce procédé on ne peut rendre ni trop fortes, ni trop nombreuses, parce que le résultat est certain et qu'autrement le parasitisme pourrait prendre un développement tel, qu'il entraînerait la mort de parties végétales, dans lesquelles un parasitisme plus modéré aurait donné lieu, pendant longtemps, à une excrétion abondante.

Delft, Laboratoire de Microbiologie
de l'Université Technique.

An obligative anaerobic fermentation Sarcina.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. VII, 1905, p. 580—585. — Verscheen onder den titel »Een obligaat anaerobe gistingssarcine« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afdeeling, Amsterdam, Deel XIII, 1905, blz. 608—614; en onder den titel »Une sarcine de fermentation anaerobie obligatoire« in Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome XI, 1906, p. 199—205.

The following simple but yet delicate experiment gives rise to a vigorous fermentation, caused by a sarcine, wherein microscopically no other microbes are perceptible and which, when rightly performed, can produce a real pure culture of this fermentation organism. The simplicity of the experiment is the result of many previous investigations, partly made conjointly with Dr. N. Goslings, which have gradually rendered clear the conditions of life of the examined microbe.

Bouillon with 3 to 10% glucose, or malt wort, is acidified with phosphoric acid to an acidity of 8 cc. normal per 100 cc. of culture liquid and introduced into a bottle, which is quite filled with it and fitted with a tube to remove the gas. The infection is done with an *ample quantity* [1]) of garden soil, from which the heaviest and roughest portion has been removed, but in which so much solid substance is left behind that in the nutrient liquid it forms a muddy deposit from 5 to 7 or more millimeters thick. The culture is effected in a thermostat at 37° C. After 12 hours already the liquid is in a strong fermentation, which lasts from 24 to 36 hours, and whereby the surface is covered with a rough scum, produced by gas bubbles mounting up from the depth. Whilst the liquid itself remains wholly free from microbes, the microscopical image of the deposit shows a luxuriant, pure or almost pure culture of a sarcine, of which the elementary cells measure for the greater part about 3.5 μ, so that the species belongs to the largest forms known, and the multicellular sarcine-packages are easily visible to the naked eye. The cells are colorless and transparent and the packages present irregular sides. Here and there, but much less generally, a brownish intransparent form is seen, with more regularly cubical packages of which the cells measure 2 to 2,5 μ.

The scum floating on the fermenting fluid consists of slime in which the evolved gas remains for a time imprisoned. This slime is produced by the outer side of the sarcine cells, whose walls for the rest consist of cellulose, which becomes violet-blue by zincchloride and jodine. This reaction was discovered in 1865 in the stomacal sarcine by Suringar [2]), who on this account argued the vegetal nature of this

[1]) With *little soil for infection*, the experiment becomes doubtful.

[2]) W. F. R. Suringar, De sarcine (*Sarcina ventriculi* Goodsir), pag. 7, Leeuwarden 1865. Here very good figures are to be found.

organism, which fully corresponds to the small-celled fermentation sarcine. The large-celled form more resembles the figures which L i n d n e r [1]) gives of his *Sarcina maxima,* found, as he expresses it, in »Buttersäuremaischen«, hence, in wort wherein a spontaneous butyric fermentation. I am not, however, convinced that both these forms do really belong to two different species of sarcine, as it is well known that in this genus of microbes great morphological differences may occur in the same species.

The gas is a mixture of about 75% carbonic acid and 25% hydrogen; methan is not present. Besides, a moderate quantity of acid is formed, which for example, in a nutrient liquid with an acidity of 6 cc. per 100, may mount to 12 cc., a percentage only found back in the technical lactic fermentations. Furthermore a peculiar odor originates, reminding of the ordinary lactic-acid fermentation, by *Lactobacillus.* If, as is probable, this acid will prove to consist entirely, or for the greater portion, of lactic acid, the fermentation sarcine may be considered as the most differentiated lactic-acid ferment hitherto known.

When using a sufficient quantity of soil for the infection, that is a relatively great number of sarcines, which thereby, in the given circumstances, may compete with advantage with, and conquer all other microbes, the experiment described succeeds within very wide limits. Thus the sarcine fermentation may *in this case be obtained as well in an open flask as in a closed bottle,* whence it follows that the sarcine can suffer a moderate quantity of oxygen; and it will appear below, that a slight quantity is even wanted under all circumstances. Notwithstanding this, the name of obligative anaerobic remains applicable as the cultivation at full atmospheric pressure is impossible. The acid may further be varied between 3 and 11 cc. normal phosphoric acid per 100 cc. The phosphoric acid may be replaced by lactic and even by hydrochloric acid, if the acidity of the latter is not taken higher than 6 to 7 cc. per 100 cc., but not by nitric acid.

Instead of glucose cane sugar may be used, but with milk sugar and mannite the experiment does not succeed. As source of nitrogen only peptone can be used, such as found in malt-wort or bouillon: simpler nitrogen sources, like asparagin, ureum, ammonia and saltpeter, are unfit for the nitrogen nutrition of the sarcine. The limits of the temperature are wide and may vary between 28° C. and 41° C.

Although the experiment may thus be modified in many respects, the first described arrangement is recommendable, as it is best adapted to the optimum of the different conditions of life of the organism.

A property peculiarly important for this research is the readiness with which the function of fermenting, that is the power of evolving gas, gets lost under the influence of a secretion product, probably the acid, and through which all transports with old material become perfectly useless. Hence it is necessary to transport cultures still in fermentation to insure the success of further experiments.

That some aeration enhances the life-functions of this obligative anaerobic and that access of a little air is even necessary in the long run, is evident from the fact that the most vigorous fermentation are obtained in a closed bottle, with the deposit got in an open flask, whereas renewing of the nutrient liquid formed above the de-

[1]) Mikroskopische Betriebscontrolle in den Gärungsgewerben, 3e Aufl. p. 432, 1901.

posit in a closed bottle will after few repetitions give rise to diminuation or cessation of the fermentation.

For the continuation of the culture by inoculating *slight quantities* of material of a rough fermentation into the same nutrient liquid, two precautions should be taken. First, the inoculation should be done into the medium, freed from air by boiling, the bottle being entirely filled with the hot liquid, so that on cooling no air can dissolve. Second, an acidity of less than 7 proves not sufficient, hence this should be 8 or 10 cc., as otherwise the lactic acid ferments might prevail and supplant the sarcine.

From the necessity of expelling the air we see that the fermentation sarcine undoubtedly belongs to the ordinary anaerobics, which, considering the success of the rough accumulation experiment *with aeration,* might perhaps not have been expected; but the fact holds good in the same way for the butyric acid ferment, generally accepted as an obligative anaerobic, so that, also with respect to the fermentation sarcine, there should be spoken of »microaerophily«. Further examination shows that in deep test-tubes with maltwort-agar, very easily pure cultures may be obtained, whereby the sarcine is recognisable by the obvious size the remarkably rapid development of its colonies. On the other hand, on maltwort, or broth-bouillon-glucose-agar-plates with or without acid at 37° C., with access of air, no growth at all of the sarcine takes place, as might be expected. Of course the packages can also be seen on the plates without growing and be removed in a pure condition. When we make use of little acid for the rough accumulation, colonies of lactic acid ferments, belonging to the physiological genus *Lactobacillus,* will develop on the plates at the air, which can grow as well with as without air, but whose other life conditions correspond to those of the sarcine. In this case the experiment shows at the same time that everywhere in garden soil real lactic acid ferments are present, whereof the proof had not been given until now.

When using much acid, for example 10 cc. or more normal acid per 100 cc. of culture fluid, through which the vital functions of the sarcine, such as rapidity of growth and the faculty of assimilating oxygen, are lessened, certain alcohol ferments, proper to garden soil, come to development, but they can, together with some of the other impurifications of the rough accumulations, as moulds, *Mucor* and *Oidium,* be checked and expelled by exclusion of air, hence, by culture in closed bottles. To this end however, it is necessary to render the conditions for the sarcine as favorable as possible and not allow a temperature below 37° C.

The staying out of the butyric acid fermentation (caused by *Granulobacter saccharobutyricum*), which so readily originates with exclusion of air in glucose-bouillon and maltwort, is due to the acidity of about 8 cc. or more, whereby this fermentation becomes impossible.

Although it is evident from the foregoing, that the growth of the sarcine is less inhibited by the acid than that of the lactobacilli and of the butyric ferment, it may still be easily proved that already 7 cc. acid per 100 cc., are less favorable than 3 or 5 cc., also for the development of the sarcine itself, so that the higher amount of acid in the accumulation only serves to render competition with the said ferments possible. If by timely transports into maltwort with more than 8 cc. phosphoric acid, or by separation in solids, real pure cultures are at disposal, the further transfers,

with entire omission of the acid, show that then also vigorous growth and fermentation may occur. We thus see how wide the limits are of the life conditions of the sarcine, as soon as competition with all other microbes is quite out of question.

The discovery of this certainly unexpected fermentation has sprung from the working out of the general question which organisms of the soil can develop in a sugar-containing culture fluid in presence of an acid and with imperfect aeration. At temperatures of about 30° C. and lower, alcoholferments. *Mucor racemosus* and *Oidium* prove to be the strongest, but then already a few sarcines are observed. At about 40° C. most alcoholferments of garden soil, besides *Mucor* and *Oidium* can no more compete with the sarcine and the lacto bacilli, which then become predominant. This being fixed the last steps which led to the culture of the fermentation sarcine alone, were the recognition of the obligative anaerobiosis, and of the superiority of the resistence of the sarcine with respect to anorganic acids compared with that of *Lactobacillus* and the butyric ferments.

Above, already, I pointed to the perfect correspondence of the small-celled form of the fermentation sarcine to the description which Suringar gives of the stomacal sarcine, and I suppose that in the cases of non-cultivable *Sarcina ventriculi,* of which, for instance, de Bary speaks [1]), there should really be thought of the fermentation sarcine. This view is supported by different observations in the older literature, cited by Suringar. But still more convincing is my accumulation experiment, which proves that the conditions for the existence of this sarcine are just of a nature to render its life in the stomach possible.

It will be easy to obtain certainty thereabout by a repetition of this experiment, not with garden soil for infection material, but by using the stomacal contents of such a case of stomacal sarcine. The »not cultivability« of de Bary may mean the same as anaerobiosis, for it is well known how difficult it is, even at the present time, to cultivate anaerobics if the particulars of their life conditions are not exactly known.

For the rest I do not doubt of the precision of Falkenheim's [2]) and Migula's [3]) observations, who have seen aerobic colonies of micrococci originate from stomacal sarcine. It is true that I for my part have not succeeded in confirming this observation with regard to the fermentation sarcine, but for other species of *Sarcina* I have, with certainty, stated the transition into micrococci, and with various anaerobics, although not belonging to the genus *Sarcina,* I have seen now and then colonies originate of facultative anaerobics, which in all other respects, corresponded to the obligative anaerobics used for the cultures. Therefore this modification also seems possible for some individuals of the fermentation sarcine. Accumulation or transfer experiments with stomacal contents will however only then give positive results, if these are used when still in fermentation; with long kept material nothing can be expected.

Already the older observers [4]) as Schlossberger (1847), Simon (1849) and Cramer (1858) have tried, although in vain, by a kind of accumulation ex-

---

[1]) Vorlesungen über Bacterien, 1e Aufl. pg. 96, 1887.

[2]) Archiv f. experiment. Pathologie und Pharmacologie. Bd. 10, pg. 339, 1885.

[3]) System der Bacterien. Bd. 2, pg. 259, 1900.

[4]) Cited from Suringar (l. c.).

periments, to cultivate the stomacal sarcine, wherefore they prepared, as nutrient liquid, artificial gastric juice with different additions. Remarkable, and illustrating the biological views of those days, is the fact, that for the infection they did not use the stomacal contents themselves, but beer yeast, supposing, that the sarcine might originate from the yeast cells, which somewhat resemble it, and are always found in the stomach together with the sarcine itself.

On Lactic acid fermentation in milk.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. X, 1907, p. 17—34. — Verscheen onder den titel »Over melkzuurgisting in melk« in Kon.Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel XV, 1907, blz. 883—901; en onder den titel »Fermentation lactique dans le lait« in Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Haarlem, Série II, Tome XIII, 1908, p. 356—378.

In milk left to itself, which in consequence of spontaneous infection, contains the more generally distributed germs with certain regularity some special floras are observed, whose composition is chiefly controlled by two factors: temperature and oxygen pressure. If the latter is very slight, that is, if the microbes of the milk are reduced to more or less anaërobic conditions, the floras become simple of composition and produce certain fermentations. The three principal of these are the Aërobacter-, the Butyric acid- and the Lactic acid fermentations, of which the two first are always characterised by the evolution of hydrogen and carbonic acid, whilst in the lactic acid fermentations, which may occur under different forms, beside the lactic acid, no gas at all, or carbonic acid only is formed. Sometimes this fermentation is accompanied by a vigorous slime formation, which slime consists of the swollen cell walls of the inferred lactic acid ferments.

For domestic purposes the lactic acid fermentation should be considered as useful; both the others as noxious.

The fermentation experiment the dairy industry applies to judge of the purity of milk has for its object to determine the commonness or the rarity of the germs of Aërobacter and of the butyric acid ferment. To this end a high standing glass is filled with milk, placed in a water bath of 40° C. and it is observed whether any fermentation gas is evolved, and if so, after how much time. In good milk this production of gas does not occur because then the lactic acid ferments develop so quickly that the other microbes are expelled. Artificially the Aërobacter fermentation is easily obtained by infecting non-acidified milk with faeces, soil or canal water and cultivating at about 37° to 40° C. After 6 to 12 hours production of gas is observed originating from *Aërobacter coli* or more rarely from *A. aërogenes*. The nature of the thereby obtained varieties changes with the temperature.

At temperatures beneath 40° the Aërobacter fermentation, after lasting some hours, is replaced by a butyric acid fermentation which again, after some time is succeeded by a lactic acid fermentation. Externally the Aërobacter and the butyric acid fermentations cannot be distinguished, but this can be done easily with the microscope.

If 3 to 5% chalk is added to a culture in a stoppered bottle at 35° to 40° C., the butyric acid fermentation can go on longer, and by early transplanting, likewise in milk with chalk and with exclusion of air, check the development of lactic acid ferments, without, however, quite dispelling them.

Microscopically the butyric acid fermentation may be recognised by the long, thin, at neutral reaction highly motile rods, sometimes mixed with elongated or more rounded clostridia, colouring blue by iodium, all belonging to the species *Granulobacter saccharobutyricum.*

To accumulate from such a crude butyric acid fermentation in milk the lactic acid ferments, which hardly ever lack there, it will suffice to transplant some drops into milk without chalk, and, if necessary, to repeat this after the butyric acid fermentation, which always sets in at first, is finished. Whether this be done in open or closed bottles or tubes, at 37° to 40° C., lactic acid rods of the genus *Lactobacillus* will be seen to appear, which by repeated transplantations completely dispel the butyric acid ferments.

If in these experiments instead of using fresh, unheated infection material, the soil, water, or faeces are previously heated to 80° or 95° C., by which only spore-forming microbes can develop in the milk, the fermentations of *Aërobacter* and the lactid acid ferments do not arise, their germs producing no spores, but a butyric acid fermentation is obtained, from which the aërobic spore-formers may be dispelled by repeated transplantation at exclusion of air.

1. *Properties of the active lactic acid ferments.*

As many bacteria of the most different groups can produce lactic acid it seems not superfluous to indicate what are the characteristics of the lactic acid ferments proper.

The active forms of dairy industries, yeast manufactories, distilleries, tanneries, and breweries, although joined by transitions, may be practically classified into the physiological genera *Lactococcus, Lactobacillus* and *Lactosarcina,* of which the two first only occur in the dairy products [1]).

They are always immotile, no-spore forming bacteria, which bear drying very well and which, by heating to 65° or 75° C., in which they just remain alive, while these temperatures are deadly ao most other non sporeproducers, may be separated from these (»lacticisation«). They require for nitrogenfood peptones, such as are found in milk, malt extract, or other juices of plant- or animal origin, and for carbon food certain sugars, which may differ for different species. They do not peptonise proteids and, thus, do not liquefy gelatine; the secreted lactic acid can dissolve a certain quantity of caseine, but chemically this substance remains unchanged. These circumstances regulate their distribution in

---

[1]) In the chief floras of milk- and dairy products occur, to my knowledge, no species of *Lactosarcina.* When Emmerling asserts to have found a yellow *Sarcina* in Armenian mazun (Centralbl. f. Bacteriologie, 2te Abt. Bd. 4, p. 418, 1898), this can only have been a common infection from without. Also in butter sarcine species may accidentally occur but they do not belong to the chief flora, which consists of lactic acid ferments and lipophili.

nature, where they are by no means general, but may rapidly, multiply, especially under the influence of man. They are, however, found in the soil and can, by methods mentioned below, be accumulated and cultivated in a condition of pureness.

They are always more or less distinctly microaërophilous, some species or varieties can, however, grow very well at the air; other forms cannot and behave as real anaërobics. Access or absence of air is commonly of no consequence to the acid formation, but in the yeast industry a species is used, which at full atmospheric pressure produces no acid, and in the dairy industry are also forms which display the same property.

Always, even on good nutrient media, to which belong in particular maltextract agar, and milk- or whey-agar, the growth of the colonies remains limited, especially if the air and the produced acid can act simultaneously. If the acid is neutralised by chalk the growth of the colonies at the air may also become important. Yet, in most cases, the recognition of these ferments may repose on the smallness of their colonies compared with those of other bacteria.

Catalase is constantly absent, and hereupon an excellent diagnosis can be based, for which it is only necessary that a culture plate, on wich all kinds of bacteria may occur, be flowed with strongly diluted hydrogensuperoxyd which is by all microbic species, except the lactic acid ferments, indifferently whether they belong to *Lactococcus*, *Lactobacillus* or *Lactosarcina*, changed into a scum of little oxygen bubbles.

Even the lately described[1]) large celled *Sarcina*, which in consequence of continued research I now consider as identic with the stomach sarcine *(Sarcina ventriculi)*, and whose acid producing power is very slight, – i. e. 3 c.c. of normal acid per 100 c.c. of maltextract or glucose broth, — does not at all decompose hydrogen superoxyd.

If we consider how generally catalase is met with in the animal and vegetable kingdom, as also in the microbes, its very absence in the lactic ferments appears in a peculiar light.

All active lactic acid ferments from milk invert sugar (invertase reaction) and can more or less easily decompose esculine and indican (emulsine reaction). The reaction on esculine is demonstrated by introducing, for example, 0,1% of this substance and a fews drops of ferricitrate solution into whey agar or whey gelatin. Streaks drawn on it of species which decompose esculine produce intensely brown or black diffusion fields of esculetiniron, brown at more alcaline, black at more acid reaction, so that the lactic acid ferments become recognisable by the black fields in the midst of which their colonies are placed[2]). So long as esculine is present it is recognised by the magnificent blue fluorescence of the whole plate at feeble alcaline reaction. Indican may be used in a corresponding way but then no iron salt is wanted as the indoxyl produced from the glucosid oxidises of itself at the air to indigo blue. The lactic acid ferments decompose

---

[1]) These Proceedings 25 February 1905. Archives Néerlandaises T. 1 and 2. T. 11, p. 200, 1906.

[2]) The knowledge of this extremely sensitive reaction, which has been applied for years in my laboratory, I owe to my colleague Mr. H. Ter Meulen.

these two glucosides, slowly indeed, yet these reactions are very characteristic and useful. Amygdaline is not decomposed by the lactic acid ferments[1]).

To the most remarkable properties of the lactic acid ferments belongs their power of reducing levulose to mannite[2]), which latter substance may even in concentrated nutrient solutions be recognised by its ready cristallisation at evaporation. A single drop dried on the object glass, commonly gives at microscopical investigation full certainty as to the existence of this reaction.

The lactic acid ferments thereby strongly contrast with the so nearly allied vinegar bacteria, in as much as the latter do just the reverse, i. e. they change by oxidation mannite into levulose.

Like so many other bacteria the lactic acid ferments possess, also with regard to various pigments, a strongly reducing power, as is easily shown by inoculation into deep test-tubes of boiled milk coloured with litmus. The red litmus is first in the depth, later till near the surface quite discoloured, to turn red again by shaking with air. The thickness of the red layer in the curdled milk admits an accurate measure of the intensity of the growth and of the reduction process. The thinner the red layer the more intensive both functions must be.

2. *Factors of variability.*

Many, perhaps all lactic acid ferments display a high degree of variability as well in physiological as in morphological properties. Nevertheless this variability in different stocks, coming from different isolations of the same species, is not always equal by far, which may give rise to trouble in the study of the specific properties. The circumstances causing the variability are but partly known; decidedly belongs to them an oxygen pressure, too far above or too far beneath the optimum for the vital functions, which may, especially for the bacterium of the long whey (*Lactococcus hollandiae*), be demonstrated with exceeding clearness.

This remarkable species is characterised by a vigorous slime formation when cultivated in milk or whey, but loses this power at temperatures above 20^0 C., as well at the ordinary pressure of the atmospheric oxygen, as at complete exclusion of it, if the changed influence is allowed to act during some time on the growing microbes. This is shown by cultivating the whey in a closed bottle; the upper layer, just beneath the stopper, where a little air can find access, becomes quite liquid and contains a hereditarily constant, common *Lactococcus*, forming little acid and no slime. Also by cultivating the long whey microbe in tubes of boiled milk with access of air, after one or two re-inoculations, a *Lacto-*

---

[1]) Amygdalin is decomposed with much more difficulty by the action of microbes in general than the other glucosides named in the text. Moulds mostly decompose it into amygdalinate of ammonium; beer yeast into amygdalonitril glucosid and glucose. Splitting under production of bitter almond oil, hydrocyanic acid and glucose I detected hitherto only with *Saccharomyces apiculatus* and with the anaërobic ferment of butyric acid fermentation, *Granulobacter saccharobutyricum.*

[2]) Ferments lactiques de l'industrie. Archives Néerlandaises 1901. Kayser, Fermentation lactique. Annales de l'Institut agronomique 1904.

coccus is produced, which forms no slime at all. I the material for the re-inoculation is secured from the depth of the cultures grown in closed flasks, at places where the access of air is impossible, and the inoculation is repeated once or more in the same way, a *Lactococcus* is likewise obtained which displays no trace of slime production.

At some depht beneath the surface, however, is a zone in which unchanged, slime forming, hereditarily constant material is found.

What in this case can be very easily ascertained, proves, at accurate investigation, also to be true for the other species of lactic acid ferments, namely, that they only then continue to display constant specific characters, when they are continuously cultivated at a certain pressure of the oxygen, else, these characters are seen to disappear, whilst in fact, or apparently, news ones originate. Hence, in some cases it may be proved, in others the probability is shown, that each species must occur in three varieties, joined by intermediate forms, i.e. the normal form, a »high pressure variant«, and a »low pressure variant«.

As in wholly different groups of bacteria corresponding facts may be observed, there is cause to assign a fundamental signification to them.

A decisive factor which may cause the production of variants is furthermore the temperature, fox experience proves that a prolonged cultivation above the optimum temperature of growth, gives rise to the appearance of forms distinctly different from the original stock.

In other cases the cause of the variability is unknown; not seldom for example, we find at the very first culture of a species taken from nature, strongly varying colonies, which prove to belong to the same species only because many colonies by sector-variation display the genetic alliance ot the variants to the wild stock.

But then, too, there is reason to admit that the new vital conditions, to which the microbes are subjected just by the change of oxygen pressure and temperature, are the chief factors of the variation process which is, as it were, seen in action. This observation is of so general a nature and is so closely related to the essence of life, that it must be considered as probable, that also in higher plants and animals, local changes in the access or exclusion of oxygen, in connexion with temperature, play an important part in the morphogenesis.

As the examination of other species of microbes shows that the absence of certain nutrient substances in the culture medium, at free aëration and during growth, may cause hereditary variation, for example in *Schizosaccharomyces octosporus*, which in old cultures changes into the spore-free variant, totally differing from the chief form, there is reason also to believe, that also the said factor must be considered to explain the great variability of the lactic acid ferments; but the observations there about are not yet fit for definite conclusions.

3. *Elective culture of the microbes of the slimy lactic acid fermentation.*

There is reason to assume that the slime producing lactic acid ferments are the normal forms and the non-slime formers, species or variants derived from them. Hence, the former deserve to be considered in the first place.

To the typical slime producing species belongs the microbe of the long whey *(Lactococcus hollandiae)*, which particularly before the introduction of pure cultures in the dairy industries, played an important part in the fight against cheese defects in North-Holland, and is still here and there practically used to that end.

Further I have found that the popular food known in Norway as »tjaette molken«, a sample of which I owe to the kindness of Mr. Pennink of Rotterdam, consists of milk, in which the long whey microbe, or at least a nearly allied form, secretes acid and slime.

Other materials in which these and allied microbes occur, were till now unknown, evidently because of the uncertainty about culture conditions and the lack of a good accumulation method. Taking the idea »species« in the broad sense, I think there is no objection as to bringing the group of forms, found in the manner described below, to the species just mentioned.

Starting from the following properties, the most characteristic for the microbes of the slimy lactic acid fermentation:

1st. The optimum temperature for their growth is at 20^0 or lower,

2nd. they can only compete in anaërobic cultures with the other microbes, and

3rd. the medium must consist of substances containing peptones as nitrogen and carbonhydrates as carbon source, I succeeded in finding a method giving rise to their accumulation.

It is true that I only examined a single material in this way, the common baker's yeast, but the investigation of the soil of fermenting or fermented substances, in short of materials of most varying description may be done in a corresponding way.

The experiment is arranged as follows.

Into a 30 c.c. closed bottle, filled with maltextract, to which is added ½% of peptone siccum and which contains c.a. 10% extract, a little pressed yeast is introduced, for instance ½ gram. Placed at a temperature of 18^0 to 20^0 C. a quiet fermentation sets in, which is allowed to continue 24 to 72 hours, whereby, because of the absence of air the yeast hardly grows, but the various lactic acid ferments reproduce quickly. Other microbes do not develop. Not seldom in this first culture have the contents of the flask already become somewhat slimy.

Whether this be the case or not, a not too small quantity from it is transplanted into a bottle quite filled with boiled, air-free milk, for instance ½ c.c. into 30 c.c. of milk. At the same low or a somewhat higher temperature only a flora of lactic acid ferments can develop, and if the slime-forming species is present, it is the most vigorous. We then see that after 2 or 3 days the milk become slimy and by inoculation into milk whey, a culture will start which sometimes differs so little from the ordinary long whey, that we may conclude to an identity of species.

Of course, I cannot foretell that such microbes occur in any yeast sample taken at random, hence I must add that for my experiments I used pressed yeast from the Yeast and Alcohol manufactory at Delft.

Such a culture in milk differs it is true in some respects from what is obtained by growing long whey from North Holland in milk, as in the former

case short rods or oblong cocci are observed, and in the latter, shorter forms more reminding of the common micrococci.

I expect that by repeating this experiment various deviating varieties will be found, and by application of the method to other infection material perhaps new species of slime lactic acid ferments may be discovered.

4. *Elective culture of the lactococci of cream souring.*

As the lactococci and lactobacilli, which both occur in spontaneously or otherwise soured milk, in cheese, and various other dairy products, seem to grow nowhere better than in milk,[1]) the culture experiments here considered, should be taken with milk.

In order out of the innumerable microbes of the crude milk practically to come to a pure culture of *Lactococcus*, the management is as follows.

The optimum of growth is at 30^0 C. or lower, and as all species of *Lactococcus* (like those of *Lactobacillus*) are strongly microaërophilous, sometimes even anaërobic (i. e. cannot grow at all at full atmospheric pressure on plates), it is best to cultivate in absence of air.

A stoppered bottle is quite filled with commercial milk and placed at 30 C. After 24 hours or somewhat later a *Lactococcus*-flora begins to replace the other microbes, while not seldom a feeble fermentation of *B. coli* or *B. aërogenes* has preceded.

After one or two re-inoculations under the same conditions, but into well boiled milk, which is done by transferring a trace of the first culture to the second bottle, quite filled with boiled, air-free milk, and so on, the lactococci free themselves completely from all foreign microbes and a material is obtained, which displays a high degree of purity and of practical usefulness. If the acidifying power of the microbes obtained by the experiment is lower than wished for, for example 5, whilst 8 to 10 c.c. of normal acid on 100 c.c. milk is desired, this must be attributed to the accidentally present stock. It is necessary then to begin a new experiment, following the same way as described, or it can be advisable to perform the first inoculation with some good butter-milk.

As buttermilk, however, very often contains lactose yeast, in the latter case a vigorous alcohol fermentation may at first be expected in the bottles. But it soon disappears by inoculation into milk rendered free from oxygen by boiling.

If in this way, thus in absence of air, the culture has been prolonged, a fairly constant acid amount is obtained at each renewed inoculation, which does

[1]) It is not impossible that there are »peptones« which, together with glucose or lactose, are still better food for the lactic acid ferments than milk itself. How very differently peptones of dissimilar origin act on microbes is easily observed in yeast species which in general grow better on »plant peptones« than on »animal peptones«. The introduction of the word »bios« to denote those nitrogen compounds which are best fit as yeast food, is an attempt to circumscribe the peptoneproblem has been given. The relation between »peptones« and the lactic acid ferments is still closer than between these substances and the different yeasts; but it is here not the place to insist on this point.

not, however, rise above 10—12 c.c. normal in 100 c.c. of milk. On whey agar or whey gelatin plates the growth at the air of the thus obtained lactococci is different, as sometimes a great many aërobic colonies arise, which cause the same acidification as the cultures in the bottles, while in other cases nothing is seen to grow.

The first group corresponds with the usual commercial forms destined for the souring of cream, which commonly consist of cultures of the microbes dried on milk sugar or starch; moreover there are commercial aërobic pure cultures in milk or whey, which are sold in bottles.

The second group, that is the cultures non-growing at the air, may still better be used for the cream souring than the aërobic stocks, as the anaërobic forms of *Lactococcus* show more aptness to secrete the flavour desired in butter, than the more aërophilous bacteria [1]).

As well for this reason as for the great purity of the cultures made after this »bottle method«, there is reason to prefer them in dairy work to the commercial so-called pure cultures, which for the greater part are by no means pure, but mostly contain, besides lactococci, numerous contamination germs of the milk. In consequence of frequent investigations I can therefore advise insterested persons to use the here described method. Best would be if these cultures were prepared in the creameries themselves, but also the sellers of pure cultures, by following the above prescriptions, will obtain a better product than by the more usual way of selection of aërobic colonies. Besides, the management is simpler and more scientific.

To my opinion there is no satisfying ground to class the aërobic and anaërobic forms of *Lactococcus*, which can be produced after the said method, in separate species. They are but variants of one and the same species, whose oxygen requirements are different, which also appears from the fact that in the course of time one and the same stock shows considerable differences with regard to the said relation. Moreover, by several isolations all transitions between the more or less aërobic stocks may be obtained.

Finally it should be borne in mind, that by applying the »bottle method« at low temperature, in rare cases instead of a culture of real *Lactococcus* a *Lactobacillus* is obtained, which may likewise be had by colony selection from cheese. Using this *Lactobacillus* I did not observe at all the pleasant flavour of the anaërobic lactococci, so that I do not recommend these bacilli for cream souring.

5. *Elective culture of the lactic acid bacilli.*

If milk, soured spontaneously by *Lactococcus lactis*, or still better, buttermilk, is placed at exclusion of air in a thermostat of ca. 40^0 C., the original acid amount of 8 to 12 c.c. will in most cases rise after some days to about 18 or 20 c.c. per 100 c.c. of milk. For this experiment it is best to use a stoppered bottle of 250 to 300 c.c. capacity quite filled with milk. If for the first experiment

[1]) Of late I have also met with such like anaërobic lactic acid bacteria in commercial preparations.

a smaller quantity is used the result becomes uncertain, either by the disturbing influence of the air, or by the scarcity of the inferred bacteria.

The first change commonly observed in the sour milk is a moderately vigorous alcoholic fermentation, caused by the hardly ever lacking lactose yeast, and at the same time a complete separation of the caseine, which is driven to the surface of the liquid by the carbonic acid.

Microscopically we find that the lactococci present at first, are succeeded by more lengthened forms, truncated at the ends and united in chains, whereby the acid titer may considerably diminish, for instance in 12 hours from 8 c.c. to 6 c.c., which should be ascribed to the lactose yeast, for which the free lactic acid can serve as carbon food. By transference, at exclusion of air, the lactose yeast, as in the elective culture of lactococci, is rapidly dispelled by the then stronger lactic acid ferments.

Real lactobacilli mostly appear after 2 or 3 days and then the acid rises rapidly parallel to their multiplication to 20, even to 25 c.c. normal per 100 c.c. of milk. When this degree of souring is reached, there is usually no further increase observed, not even after several days, and whenever this does take place, there should be thought of aëration, by which the growth of vinegar bacteria and acetic acid formation from alcohol, have become possible.

The pure culture of lactobacilli is sometimes easy, in other cases, with more anaërobic stocks, it is more difficult. Always, however, it is troublesome with these pure cultures to obtain a considerable souring in milk and there is most chance of success (but even then the succes is not quite certain) by souring lactobacilli together with *Lactococcus* which serves for the first souring to 8 c.c. If this amount of acid is reached, and the pressure of the oxygen sufficiently diminished, which in a stoppered bottle is likewise brought about by the presence of the lactococci, the lactobacilli can develop and cause further souring.

From the observation that by the described experiment more or less perfectly anaërobic lactobacilli are obtained, follows that here as in the case of *Lactococcus* different varieties may be expected. At a continued research the differences prove to extend over other characteristics also and may become so great, as well from a morphologic as from a physiologic point of view, that it seems necessary to create new species.

Especially the dimensions of the rods, the more or less branched state of the colonies on agar plates, the slime formation, the either or not originating of carbonic acid as fermentation gas beside the lactic acid, and the action or non action on different sugars give rise to this consideration. The deeper however we enter into these distinctions, the more troublesome it becomes to devise such descriptions as are wanted to present to other investigators an image of the results of our own researches; so numerous become the forms which nature, or better perhaps, which culture produces, and so slight are the differences by which these forms are distinguished, if we do not confine ourselves to the extremes of the groups[1]).

[1]) For further information see W. Henneberg, Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien. Sonderabdruck aus Zeitschrift für Spiritusindustrie. No. 22—31, 1903. Parey, Berlin.

If the latter is done, two distinct forms call attention, which on a former occasion I named[1]) *Lactobacillus caucasicus* and *L. longus.* Without attributing a special value to this classification I yet wish to keep to it as I think that the facts to be mentioned are fairly well comprised thereby.

The longusgroup is characterised by its not acting on maltose, so that in maltextract no, or very little acid it formed, but it does decompose milksugar. In milk the forms of this goup, if grown after a previous culture of *Lactococcus* which has produced 5 to 8 c.c. of lactic acid per 100 c.c. of milk, will once more produce a certain, even a like quantity of acid so that ca. 16 c.c. may be titrated, the latter amount being however an exception. Generally no evolution of carbonic acid is observed but sometimes it is, and then so much gas can arise that a milk beverage is acquired foaming like champagne.

By a series of transitions, the longus forms obtained at 40^0 C., are joined with lactobacilli which at a lower temperature find their optimal vital conditions, but which are rarer in milk.

The caucasicus group comprises those lactobacilli, which are able, independently of lactococci to produce in milk a very high acid formation. At 37 to 40^0 C. it is possible after three days of their action to titrate 20 to 25 c.c. of normal acid per 100 c.c. of milk. When that amount is reached further acid formation stops. In this case, too, there is a parallel form which, beside much lactic acid, also evolves carbonic acid. What by-product is then formed from the lactose molecule beside the carbonic acid is not yet clear; probably it is aethylalkohol. G. Bertrand has proved that these ferments can produce succinic acid. They greatly owe their notoriety to their presence in kephir, which subject I have touched before[2]). Later however I have come to the conclusion[3]) that their distribution is by no means restricted to kephir only, but that they also occur in our climate, sometimes in buttermilk, in cheese and even in common baker's yeast.

6. *Yoghurt and maya.*

The use of soured milk as drink and food is so familiar to many Eastern countries, and dates from so remote an antiquity that there can be no doubt as to its favourable effect on health, and the establishment of various societies which try to popularise new preparations of that nature, seems to prove that te attention of the Western nations begins to be drawn towards it.

Both in the preparations of the Eastern nations and in those of industry are always found lactic acid ferments of the genus *Lactobacillus*, mostly of *Lactococcus* too. These lactic acid ferments alone determine the character of the »leben raïb« of Egypt[4]), of the »yoghurt« of Bulgary[5]), and probably also that of the

[1]) Sur les ferments lactiques de l'industrie. Archives Néerlandaises. Sér. 2, T. 6, p. 212, 1901.

[2]) Sur le Kefyr. Archives Néerlandaises. I. 23, p. 428, 1891.

[3]) Ferments lactiques de l'industrie l. c.

[4]) Annales de l'Institut Pasteur. T. 16. p. 65, 1902.

[5]) Massol et Grigoroff, Revue médicale de la Suisse romande 1905, p. 716. Bertrand et Weisweiller, Action du ferment Bulgare sur le lait. Ann. de l'Institut Pasteur, T. 20, p. 977, 1906.

»prostokwacha« and the »véranetz« of Russia, which Metchnikoff mentions. In the »kephir« of the Caucasus, the »koumys« of Central Asia, [1]) and the »mazun« of Armenia [2]) occurs moreover, lactose yeast, which may, however, under certain circumstances be wanting, without the character of these beverages being lost. All other microbes, which are mentioned in literature as occurring in the said beverages or their ferments, such as *Oidium*, *Mucor*, other moulds, torula, red yeast, vinegar bacteria, butyric acid ferment, proteolytic bacteria, are only present by deficient preparation, so that it may be said that in all examined cases a pure lactic acid fermentation proves to be the wanted process, whilst eventually also an alcoholic fermentation is whised for or suffered [3]).

Hence, in the commercial preparations which start from yoghurt, only lactic acid ferments are cultivated. I have in particular investigated the products of »Le ferment«, mentioned beneath, as also a substance, sold as »maya« or Bulgarian ferment, [4]) to which my attention was drawn by Dr. De Lint at Scheveningen. Here I will shortly describe the latter preparation.

It consists in a yellowish strongly acid reacting powder, composed, after chemical, microscopical and bacteriological examination, of caseine lactic acid, lactose, fat and lactic acid bacteria; it is evidently nothing else but yoghurt evaporated at low temperature, perhaps in the vacuum. As to the preparation of the »yoghurt« itself by means of this ferment, it is done as follows and gives good results.

Milk is evaporated to half its volume, cooled to a (not nearer indicated) temperature, for which I took 40^0, as 45^0 proved too high and 37^0 too low, and on a quantity of 250 c.c., so much ferment is strewn as can be put in a little spoon distributed with the flacon containing the maya. After 6 hours already the curdling of the milk becomes perceptible, after 24 hours I titraded 12 c.c. and after 3×24 hours 20 to 23 c.c. of normal lactic acid per 100 c.c. of the evaporated milk, which by that time is changed into yoghurt.

As a titer of 10 c.c. corresponds to 0.9 % of lactic acid, the titer 20 corresponds to somewhat less than 2 % of the vanished milk sugar. Supposing that the evaporated milk contains about 9.6 % of milksugar it follows that 7 % of milksugar has remained undecomposed. The caseine is of course curdled and the whole has changed into a solid but soft, sweet tasting mass.

---

[1]) For Kephir and Koumys see Weigmann in Lafar Technische Mykologie. Bd. 2. p. 128. 1905.

[2]) Centralblatt für Bacteriologie, 2te Abt., Bd. 15, p. 577, 1906.

[3]) The study of literature leads at first view to a quite other result, as many microbiological descriptions are made by beginners, not sufficiently acquainted with the properties of lactic acid ferments, and who have attributed an exaggerated weight to the different kinds of infections named above.

[4]) On the bottle stands: Maya bulgare, Société de la maya bulgare, Garnier & Co., Paris, 16 Rue Popincourt. The Société de Pury, Montreux, brings into commerce a ferment of the same nature under the name of »maya bacilline«, and theSociété Henneberg, Geneva, a liquid preparation as »lacticose«. Besides there are to be had in Paris Lactobacilline de Metchnikoff in »Le Ferment«, Fournisseur de l'Assistance publique, 77 Rue Denfert-Rochereau, who sells also, the »Biolactyle« of Fournier and the »Baciline paralactique« of Tissier (the preparations of this firm make a very good impression).

The evaporation of the milk is not necessary, but when prepared from ordinary milk, the yoghurt remains more liquid, and as the acid formation is equally strong as in evaporated material, there remains about 2.5% of the original 4.8% milksugar, so that in this case the taste is much less sweet.

If in the said way yoghurt has been prepared in the presence of air and is re-inoculated into a new quantity of milk, then the result is yoghurt of the same acidity as the first time. But after 3 or 4 transferrings difficulties arise and only with great quantities of infection material further souring can be obtained. The experiment succeeded much better when the yoghurt was prepared in a quite filled stoppered bottle; the transferring can then be longer continued, but I do not know whether this will do in the long run. Evidently the difficulty here, too, is the right choice of oxygen pressure, whereby the inferred lactic acid bacteria preserve their properties unchanged; and this difficulty is still increased by the presence of two different forms, with unequal optima as to temperature, and probably as to oxygen pressure also.

One of these forms is again a *Lactococcus*, the other a *Lactobacillus*.

The former deviates somewhat from the common *Lactococcus*, in as much as it is more extended, reminding of short rods, and furthermore by possessing a higher optimum as to the temperature whereby the growth is quickest, which optimum proves nearer to 37° than to 30° C. Hence, this forms is as it were a transition to a *Lactobacillus*. Isolation on milk agarplates was very easy, even at 30° C.

As to the second species, the *Lactobacillus* proper of yoghurt, it was troublesome to grow its colonies on milk agar plates, but on malt extract agar it was more easily obtained. In literature it has been named *Bacillus Massol* by Grigoroff, but I think that name superfluous as the characters correspond fairly well with those of the kephir bacilli which also occur in our country; for instance, as has been observed before, in yeast and buttermilk. Sown in slightly soured milk this *Lactobacillus* can produce the strong acid mentioned above, without the help of other bacteria. Evolution of carbonic acid does not take place and the product has a very pure taste, although a beginning of fat cleavage seems inevitable at such a high amount of acid.

Metchnikoff ascribes a very favourable influence to the use of yoghurt, as it diminishes the phenomena of autointoxication starting from the intestinal canal, and he explains this effect by accepting that the *Lactobacillus*, after passing the stomach, continues active in the intestine, and checks [1]) the formation of the obnoxious products which derive from other bacteria species. I do not doubt but this may be brought about by the lactic acid, but I think it highly improbable that the presence of the lactic acid bacteria from the yoghurt themselves should be required in the intestine. I think this conclusion is necessary, first because, without the use of yoghurt or other soured milk preparations, there occur in the intestine lactic acid ferments of different species, and second, because the con-

[1]) Quelques remarques sur le lait aigri. Rémy, Paris 1907. In this paper Metchnikoff gives many assertions but no decisive experiments. Besides, his bacteriological elucidation, p. 26, is not clear. The elaborate and interesting work of Dr. A. Combe, L'autointoxication intestinale, Paris 1907, is neither quite convincing from a microbiological point of view.

ditions for lactic acid formation by the active ferments are wanting or must at least be very unfavourable there.

As to the first point I refer to the following experiments.

If sterile milk is infected with faeces of different origin (man, cattle) and treated as described for the elective culture of *Lactococcus*, without access of air and repeatedly re-inoculated at a temperature between 23^0 to 26^0 C., the said genus of microbes is indeed obtained by which as good cream souring can be obtained as with the pure cultures prepared in the before described way.

If sterile milk is infected in a corresponding way and exposed to the conditions wanted for *Lactobacillus*, that is, if cultivated in absence of air at 40 to 45^0 C., a fermentation of coli will first arise and later or simultaneously a butyric acid and no lactic acid fermentation, which latter would inevitably arise if the lactic acid ferments were present in a rather considerable number. Only by repeated transferences *Lactobacillus* is produced, which after some inoculations forms 10 to 13 c. c. of normal acid.

Hence, there is no doubt as to the presence of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in normal faeces. They are, however rare, and belong by no means to the intestinal flora proper, like *coli*, but to the accidental flora, which consists of all that is introduced and is able to pass the stomach and intestines alive, without multiplying. There seems to be no cause to attribute any important influence to this fact.

As to the second point, why in the intestinal canal the conditions for the growth of the active lactic acid ferments are wanting, it is that in the contents of the intestines an alcalic reaction exists, and that the sugars which are formed or introduced there, in as much as they are not absorbed by the intestinal wall, will surely be attacked by *coli*, which in these circumstances is the stronger and dispels all competitors.

Why *coli* (and *aërogenes*) so completely defeat the lactic acid ferments, should, to my opinion, be explained by the important fact, not sufficiently considered in literature, that the first mentioned species can quite well live on peptone only, and multiply at its expense, while the active lactic ferments completely lack this faculty and, beside peptone, require a carbonhydrate for food.

If, moreover, it is borne in mind that *coli* in the presence of a carbonhydrate can also feed on other sources of nitrogen than peptone, for example on amines and ammonium salts, whereas the active lactic acid ferments cannot, and decidedly want peptones for nitrogen food, it is clear that for the different forms of *coli* practically every where in the intestinal contents a good feeding material is present, and that in the few localities where it would also be sufficient for the lactic acid ferments, it will be seized upon by *coli*. Where only peptones occur, *coli* will moreover increase the already alcalic reaction of the contents and thus, not for itself but for the lactic acid ferments, render the conditions of life more unfavourable.

Hence it seems evident why in the intestinal canal a coliflora can exist but no lactic acid flora.

The yellow coloured faeces of babies during the lactation period may be alleged to support this view. They consist microscopically almost solely of bacteria,

for far the greater part of common colibacteria [1]), among which there occur real lactic acid ferments, but as in the case described before in quite an inferior number. This fact acquires a special significance when we consider that Escherich, the discoverer of the colibacillus, has proved that this condition exists directly behind the baby's stomach, where *coli* and *aërogenes* are predominant which, in reference to the preceding, necessitates the conclusion that even at those portions of the intestines where a lactic acid flora should first be looked for, it is evidently unable to sustain itself.

There is no doubt but here too, the strongly disinfecting action of the stomachal hydrochloric acid plays a part, as this acid, at a much lower titer than the lactic acid checks the growth of the lactic acid ferments, but hence can be neutralised by much less alcali, which is not indifferent to *coli*, which produces alcali.

In so far as the theory of Metchnikoff and Combe is right, after which yoghurt or other sour milk preparations counteract the auto-intoxication from the intestinal canal, it seems certain that here should more be thought of the influence of a milk diet and the free acid taken up with the milk, than of a specific intestinal flora. But in how far the apparently proved decrease of indol and phenol, whose quantity is considered a determining the degree of auto-intoxication, deviates, at a nutrition with soured milk preparations instead of meat, from this decrease when non-soured milk is used, — to my opinion the real core of the question, — has not been considered by the said authors.

Admitting that the soured preparations really deserve to be preferred, I think that especially in Holland, it must be possible with good buttermilk in as simple a way to reach the wished for end, as with the various exotic ferments, whose descriptions give the impression that the preparators are but imperfectly acquainted with the general phenomena of the lactic acid fermentation in milk.

Although I see no fundamental difference between the use of buttermilk and yoghurt, it is certain that the latter may be prepared in a very simple way under medical control, and hence, to my meaning, deserves to be recommended in certain cases.

Summarising the preceding I come to the following conclusion.

In milk three chief forms of lactic acid fermentation, determined by temperature, are to be distinguished, namely at very low temperature, the slimy lactic acid fermentation; at a middle temperature the common lactic acid fermentation caused by *Lactococcus*; and at higher temperature the lactic acid fermentation by *Lactobacillus*.

The elective culture of the microbes of the slimy fermentation succeeds by cultivating baker's yeast in absence of air between 15^0 and 18^0 C. in malt extract and transferring to boiled milk or whey at as somewhat higher temperature. The acidity obtained remains low and amounts to 3 to 5 c.c. of normal acid per 100 c.c. of milk.

---

[1]) For different children not always the same varieties; sometimes, for instance non-fermenting forms reminding of *Lactobacillus*, for which I before indeed took such bacteria.

The elective culture of *Lactococcus* takes place by allowing milk to sour in a stoppered bottle at 20^0 to 25^0 C. and transfer it repeatedly to boiled milk at that temperature. The thereby obtained stocks of *Lactococcus lactis* are mostly anaërobic but specifically not to be distinguished from the more aërobic forms which may be produced by the same experiment. The acid mostly remains at about 8 c.c. of normal acid per 100 c.c. of milk, but may become 10 to 12 c.c.

The elective culture of *Lactobacillus* succeeds best by cultivating buttermilk in absence of air at 37^0 to 40^0 C. and inoculating it into boiled milk, at 30^0 C. and higher, the acidity can rise from 18 to 25 c.c. of normal acid per 100 c.c. of milk.

The active lactic acid ferments are very variable; as factors of hereditary constant variation are recognised cultivation at too high or too low oxygen pressure, and cultivation at a temperature above the optimum of growth.

Lactic acid ferments do not lack in the intestinal flora, but play there an inferior part.

A considerable difference between Eastern and Western lactic acid ferments does not exist.

Yoghurt and other such like sour milk preparations deserve the attention of hygienists.

Fixation of free atmospheric nitrogen by Azotobacter in pure culture.

Distribution of this bacterium.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. XI, 1908, p. 67—74. — Verscheen onder den titel »Binding van vrije atmospherische stikstof door Azotobacter in reincultuur. Verspreiding dezer Bacterie« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Amsterdam, Deel XV, 1908, blz. 46—53.

When carbon hydrates are used as source of carbon in *Azotobacter* cultures, there existed until now some doubt whether the then occurring fixation of free nitrogen was originally effected by *Azotobacter* itself or by other bacteria found in symbiosis with it, because *Azotobacter* in pure culture with carbon hydrates and free nitrogen only, does not show any considerable development.

For this reason I was formerly of opinion that in such cultures *Bacillus radiobacter,* a species closely allied to the bacteria of the Papilionaceae, and which is never absent in accumulations of *Azotobacter,* would be the real cause of the nitrogen fixation [1]).

Continued research, however, rendered this supposition more and more improbable, and the facts which are now to be stated have proved beyond any doubt that the said faculty belongs indeed to *Azotobacter* itself.

These facts have regard to the very peculiar relation between *Azotobacter* and the salts of the organic acids, more in particular to calcium malate.

1. *Calcium malate as source of carbon.*

When into a wide Erlenmeyer jar a nutrient liquid is introduced of the composition: 100 tap-water, 2 calcium malate, 0.05 K^2HPO^4, with addition of some 10—20 cM^3 canal-water, or as much soil for infection, care being taken that the layer of liquid in the jar be not thicker than 2—5 cM, on cultivation in a thermostat at 30^0 C., usally after 2 or 3 days [2]) a floating *Azotobacter* film appears, consisting of strongly motile individuals, and relatively soon obtaining a considerable thickness. Hereby so much calcium carbonate is produced that it forms a closed, floating layer, so to say a cover, on the surface of the liquid.

[1]) These proceedings of March 1901. Centrbl. f. Bact. 2te Abt. Bd. 9 pg. 1, 1902. Archives Néerl. (2) T. 8 p. 190 and 319, 1903.

[2]) Especially in spring and autumn these experiments succeed. In summer and winter *Azotobacter* seems sometimes absent in the said quantity of water.

If some of this film is inoculated into another jar containing the same medium, corresponding phenomena are seen when the culture conditions are alike. At first sight already, there can be no doubt but under these circumstances fixation of considerable quantities of nitrogen must take place, and chemical analysis proves that this is really the case.

The microscopic image of the *Azotobacter* growth in the malate commonly shows smaller individuals of greater motility than the formerly described forms which are obtained in the mannite solutions. They keep about the middle between *A. chroococcum* and *A. agilis,* and remind strongly of a variety found in America, which has received the name of *A. vinlandi.* The plate cultures of such a malate accumulation again prove not to be pure but to consist of the usual mixture of non spore-forming species. They are best grown on a medium of the composition: 100 tapwater, 1 calciummalate, 0.05 K^2HPO^4, 1 to 2 agar, on which the *Azotobacter* colonies become already visible after 12 hours at 30° C., which is not the case with any other species of microbes known to me. As these plates are somewhat cloudy by the produced calciumphosphate and the imperfectly dissolved malate, it is desirable to mix the ingredients in the way as follows. Into a culture tube are first introduced some drops of a neutral, concentrated solution of kaliummalate and herein are dissolved both the calciummalate and the kaliumphosphate, with a little water to dilute, but the smallest quantity possible, as the dissolving power of the kaliummalate is much stronger in the concentrated than in the dilute solution. Then the contents of the tube are mixed with the agar solution.

The malate plates prepared in this way have proved to be better for the growth of *Azotobacter* germs than the mannite and glucose plates, so that of a definite number of germs there develop more to colonies on the former than on the latter. Hence it has become possible more exactly to compute the number of individuals of our species present in a sample of soil than after the old method, to which circumstance we return below.

Before going further I wish to notice the following concerning other salts of organic acids as carbon food for *Azotobacter.*

Except with calciummalate there could be obtained an abundant or moderate growth with calciumlactate, calciumacetate and calciumpropionate, particularly when using canal water for the first infection. It was remarkable that the transport of a malate culture into lactate appeared to succeed nearly as well as of malate into malate, while even relatively rich crude cultures in propionate- or acetatesolutions, obtained directly from soil or water when inoculated into corresponding media, hardly grow on, if at all. This fact is the more remarkable when we consider that by inoculation of a malate film into propionate or acetate as abundant cultures are obtained as in the said crude cultures in these media. But if it is tried to continue such cultures by re-inoculating anew into propionate or acetate they also soon lose their power of growth. From this we see that the preceding culture conditions to which the inoculation material has been subjected, are by no means indifferent to the vitality of the following generations, which are evidently very easily weakened and then nearly quite lose the faculty of fixing nitrogen. The importance of this fact cannot be denied and certainly deserves a nearer examination.

Calciumcitrate, calciumtartrate and calciumsuccinate, with either garden soil or

canal water for infection, give but slowly a moderately developed bacteria film but it grows during a very long time. The film on the citrate is rich in spirilla and the *Azotobacter* form found in it differs in many respects from the ordinary varieties. In all these cases the quantity of bacteria grown during the first 2 or 3 weeks, is still too slight to necessitate a determination of the nitrogen, and could by a rough comparison with former computations be valued at some tenths of milligrams N_2 per gram of the dissolved lime salt. After a long time however, the fixation of nitrogen with these salts is also considerable.

With calciumglycolate in absence of nitrogen compounds no growth of microbes could be observed at all.

2. *Quantity of the fixed nitrogen.*

Neglecting for the moment the volatile acid, to which we shall return below, the analysis of the cultures is performed as follows.

The whole quantity of the liquid, in which are present the calciumcarbonate formed by oxidation from the malate or the other organic salt, besides the as yet not decomposed malate, the salt of the volatile acid, and the bacteria, is treated with a known quantity of normal hydrochloric acid by which the carbonic acid is expelled on heating; a then following titration with normal alkali and phenolphtaleine as indicator, shows how much calciumcarbonate is produced and consequently how of the organic salt is oxidised.

After addition of a little sulphuric acid the liquid is evaporated to dryness and after Kjeldahl's method examined on nitrogen, while in each of the materials used the rate of nitrogen is stated separately. The calciummalate of Merck, Darmstadt, proved nearly free from nitrogen.

Now follows a table of some analyses [1]) which give an idea of the amount of nitrogen fixed through *Azotobacter,* when organic salts are used as carbon food. (See table.)

These numbers show that the amount of nitrogen which can be fixed in the crude culture is at most 4.9 and 2,8 m.g. per gram of oxidised calciumsalt, obtained respectively with calciumpropionate and calciumacetate (experiment 10 and 11), while, per gram of calciummalate was fixed about 2,6 m.g. (experiment 2), and per gram of lactate 1,8 m.g. (experiment 9). It seems that the fixation goes on more rapidly at the beginning than later in the course of the experiment, whence it follows that when little of the organic salt is used proportionately more nitrogen is fixed than by larger amounts. This should be taken into consideration in judging the favourable results obtained with propionate and acetate, for then solutions were used with only 1% of the salt. As to these salts, they have proved to be in general an unfavourable source of carbon for *Azotobacter* if the *rapidity* of the growth is taken as indicator of the process, and only then to be able to give good results, when for the inoculation, cultures in malate solutions are used, in which a certain variety of our species is present. But also then, as observed above, already at the first passage

---

[1]) I owe to Mr. D. C. J. Minkman, assistant to my laboratory the determinations here referred to.

No. of the experiment and culture time	Components of culture medium in grams.	Inoculation-material	Produced calcium-carbonate in grams	Volatile acid in grams	Totally disappeared limesalt in grams	Nitrogen found after Kjeldahl in milligrams	Nitrogen fixed per gramm of decomposed calciumsalt	Observations
1 24 Febr.—10 April	4 gr of Calc. Mal. 0,05 K^2HPO^4, 200 cM^3. tapwater.	Ist re-inoculation of crude culture in canalwater in same liquid	1.57	0.403	3,3	8,1	2.5	
2 26 Febr.—4 April	2 gr. of Calc. Mal. 0,05 K^2HPO^4, 200 cM^3. tapwater.	2d transferring of the preceding.			2	5.2	2.6	
3 13 March—4 April	2 gr. of Calc. Mal. 00,5 K^2HPO^4, 100 cM^3. tapwater.	3d transferring of the preceding.	0.872					
4 26 March—29 April	12 gr. of Calc. Mal. 0,05 K^2HPO^4, 200 cM^3 tapwater.	4th transferring of the preceding.	5.7	0.632	10.7	18.1	1.8	
5 6 April—25 April	4 gr. of Calc. Mal. 0,05 K^2HPO^4, 100 cM^3. tapwater.	Pure culture of *Azotobacter*	0.552	0.112	1.1	1.6	1.5	Microscop. visible infection
6 4 April—29 April	4 gr. of Calc. Mal. 0,05 K^2HPO^4, 100 cM^3. tapwater.	Pure culture of *Azatobacter*			2.2	5.9	1.7	Microscop. visible infection
7 7 April—2 May	4 gr. of Calc. Mal. 0,05 K^2HPO^4, 100 cM^3 tapwater.	Pure culture of *Azotobacter*	0.494	0,042	0.89	1.5	1.7	No microsc. visible infection
8 13 May—29 May	2 gr. of Calc. Mal. 0,05 K^2KPO^4, 100 cM^3. tapwater.	Pure culture of *Azotobacter*	0.8103	0,036	1.39	2.49	1.8	Microcosp. and bacteriologically pure
9 6 April—23 April	4 gr. of Calc. Lactate 0,05 K^2HPO^4. 100 cM^3. tapwater, 1 gr. of chalk.	Crude culture from 1.		0,101		1.8	1.8	
10 16 March—29 April	1 gr. of Calc. Acetate 0,05 K^2HPO^4, 100 cM^3. tapwater.	Crude culture from 1.	0.576		1	2.8	2.8	
11 16 March—8 May	1 gr. of Calc. Propionate, 0,05, K^2HPO^4, 100 cM^3. tapwater.	Crude culture	0,494		1	4.7	4.7	

from acetate into acetate the growth stops almost entirely. Pure cultures of *Azotobacter* develop hardly at all [2]) in solutions of calicumacetate and natriumacetate, whatever may have been the conditions to which these cultures were previously subjected. Propionates and lactates still require a nearer investigation.

Of calciummalate, on the other hand, it has decidedly been proved that not only the crude cultures succeed very well and fix much nitrogen even at repeated passages in the same medium, but that this also holds good with regard to the pure cultures of *Azotobacter*. This is the first case in which I got the certainty that other microbes are wanted, neither in the medium nor in the infection materials, but *Azotobacter* alone to cause the said phenomena. Various authors surely have repeatedly described the fixation of free nitrogen in pure cultures of *Azotobacter*, among others of late with respect to the acetates, but never had I been able to confirm the accuracy of these statements until I made a systematic investigation with calciummalate, a salt which had never before been used to this end, although I had already called attention to it as an excellent source of carbon for *Azotobacter* in my papers of 1902.

It must be allowed that the amount of fixed nitrogen in these pure cultures is not considerable, about 1.5 m.g. for each gram of oxidised malate, but perhaps here too, will be observed a greater production if only the very young cultures are examined; then, however, only little of the salt be oxidised and the absolute quantities will of course be small.

It seems not superfluous here to call to mind that it is by no means the same whether a known amount of calciummalate be absorbed from a dilute solution or from a more concentrated one. In the latter case the malate will be more easily assimilable for the *Azotobacter* cells, which will induce a stronger oxidation and thus an increased oxygen assimilation in equal times, so that the tension of the oxygen in the liquid will be less than in the less concentrated solutions. As the growth of *Azotobacter* seems favoured by this lower tension, and in any case, a rather strong concentration of the carbon food proves favourable to the process of nitrogen fixation *in absolute quantity* this circumstance has been taken into consideration in all the experiments. Further, we did not always wait for the moment at which the malate had disappeared from the medium, but commonly it was much earlier subjected to the analysis for the reason mentioned above.

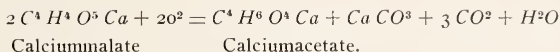
The observation that calciummalate can, glucose, cane-sugar and mannite on the other hand, cannot form the starting point for nitrogen fixation in liquid pure cultures, while yet the said carbon hydrates are in the crude cultures much more productive and may even give gains of nitrogen of 7 m.g. per gram of decomposed sugar, gives rise to the supposition that these carbon hydrates must previously be changed by other bacteria into organic acids and that these, at the moment of their production, serve as carbon food for *Azotobacter* and primarily cause the fixation of the nitrogen.

Of course it cannot be malic acid which hereby originates from the sugar; but the important growth of *Azotobacter* to which also the acetates, the propionates and lactates may give rise, suggest the question whether perhaps the acids of these salts may be first produced from the carbon hydrates and then govern the nitrogen fixation.

[1]) The different varieties behave, however differently and some will begin to grow but the growth soon ceases.

It is to be remarked that as well in the malate as in the lactate cultures slight amounts occur of a volatile acid, which will perhaps prove to be acetic acid, although it has not been positively demonstrated by means of Behrens' uranylanatrium-acetate reaction. It is of importance to know that this volatile acid is not only found in the crude, but also in the pure cultures of *Azotobacter,* so that it is certainly a product of this species itself.

In order to ascertain the amount of the volatile acid and the corresponding quantity of decomposed malate, it is supposed in the table to be acetic acid only and produced after the formula:



$$2\,C^4 H^4 O^5 Ca + 2O^2 = C^4 H^6 O^4 Ca + Ca\,CO^3 + 3\,CO^2 + H^2O$$

Calciummalate Calciumacetate.

But it may also be formed without access of oxygen. The volatile acid is determined by distillation with sulphuric acid and silver sulphate and titration the distillate with normal alkali.

From the table we see that in the crude cultures nitrogen can without doubt be fixed with calcium acetate as carbon source. In truth we have not succeeded in effecting the same in pure cultures, but now that we have the certainty that *Azotobacter* alone, with malate as carbon food, is able to fix nitrogen, it must be admitted that this also holds good for the acetate cultures, although it is not clear of what nature is the assistance which other bacteria thereby must necessarily lend. Besides it should be noted that the fixation of nitrogen in the pure cultures, also when malate is used as carbon food, is less considerable than when other bacteria, too, can live on this substance at the same time.

3. *Distribution of Azotobacter in the soil.*

Earlier, already, I showed that it is possible to detect a few *Azotobacter* colonies among the thousands of those of the other species, when fertile garden soil is sown on mannite-kalium-phosphate plates. The use of calciummalate instead of sugar has proved to be of importance for the examination of the soil in this direction. First it should, however, be observed that no solid or liquid medium [1]) could be found on which all the germs of *Azotobacter* sown out really develop into colonies. Thus, by sowing about 2400 germs (determined by microscopic counting), on various culture plates, 50, 12, 1, 30, 8, 20, 10, 20 and 75 colonies developed so that the growth in percents was only 2, 0.6, 0.5, 0.3, 0.3, 0.8, 0.4, 0.8 and 0.3. In another experiment were obtained of 10.000 germs sown on glucose-calcium, malate plates, 20, 25 and 48%, and on calcium-kaliummalate-plates 32.5, 36 and 65%. But in other cases, on agar plates with malate only the results were much better. The germs had been shaken up in sterile tap-water or in malate solutions, of which 1 cm^3 was spread over the plate, care being taken that the water was quite taken up into the agar, by its power of imbibition, which is easily effected by softy heating the plate so that the superfluous water evaporates.

---

[1]) The use of thin layers of liquid media for colony-culture of microbes has been described in Centralblatt f. Bacteriologie, 2te Abt. Bd. 20, 1908, p. 641.

We see from these data that *commonly* only a small part of the sown germs comes to growth. Whether perhaps the water itself has a deadly influence on some individuals, or that their death is caused by their passing on the solid medium, could not yet be made out by experiment. Thus, although there be ground to allow that more germs occur in the soil used than are found, the possibility exists that by continued investigation the experiment may be made so as to exclude that source of error.

But in spite of the uncertainty of the method the following result could be stated. By sowing a small quantity, for instance less than $\frac{1}{20}$ gram of garden soil on calcium-malate-kaliumphosphate 1% agar, after 24 hours at 30° C. commonly no *Azotobacter* is observed, but a moderate number of moist colonies of about 1 mm. in diameter, first draw attention by their extension and prove to consist of different varieties of *Bacillus megatherium,* containing many spores. They dont cause any considerable oxidation of the malate and as the colonies no more grow after the second day, they evidently develop at the expense of the traces of nitrogen compounds which at first are present in the plates. After the second day a great number of *Streptothrix alba* appear. This microbe is so common in all the examined samples of soil that there can exist no doubt as to its either favourable or pernicious influence on the fertility; but the nature of this influence is as yet wholly unknown.

In a still later stadium the surface of the plate becomes covered with numerous relatively small colonies of bacteria, among which some species immediately draw attention by their extension and commonness.

The oxidation of the malate by all these microbes is slight, so that even after weeks the plates contain but little calcium carbonate, which seems almost entirely produced by the said larger colonies and by *Streptothrix.* All these species seem not to oxidise at all, or perhaps it is more accurate to say, not to oxidise any more after the last traces of fixed nitrogen have been assimilated. As to *Streptothrix,* from its relatively vigorous oxidising power it follows by no means that this should be associated with fixation of nitrogen; this species surely does not possess that faculty. If for the experiment soil is used shaken from the roots of garden-plants, which are no Papilionaceae, the result is fairly the same; perhaps the number of the above mentioned oxidising forms is more numerous, but this is still doubtful.

Otherwise, however, is the result when the soil is examined which adheres to the roots of clover, pease, and beans when these plants are cautiously dug up. When the soil adhering to such roots is rubbed fine and after dilution in water sown on a malate plate we find, after a period of 2 days at 30° C., first that the said oxidising colonies have very abundantly developed. But, besides, among these colonies much larger ones are distributed, which oxidise much more vigorously and prove to belong to *Azotobacter,* which shows that a distinct relation exists between the distribution of this genus and the said Papilionaceae. Whether this relation will appear to be universal and what may be its signification, further experiments have to decide.

Beobachtungen über die Entstehung von Cytisus purpureus aus Cytisus Adami.

Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Berlin, Band XXVI a, 1908, S. 137—147.

Seit meiner ersten Mitteilung über diesen Gegenstand [1]) war ich in der Lage, noch eine Reihe neuer Fälle von der Entstehung von *Cytisus purpureus* aus *Adami* zu beobachten und darüber wünsche ich folgendes zu berichten.

Im Jahre 1903 hatte ich an einigen Exemplaren von *C. Adami* um die Mitte Mai, als die Blüten sich öffneten und das Laub ausbrach, alle ein- und zweijährigen Zweige kurz eingeschnitten, so daß die Schlafaugen des Vorjahres sowie die Sommerknospen am einjährigen Holze zur Entwicklung kommen mußten. Im August stellte sich heraus, daß sich darunter nicht weniger als vier selbstständige *Purpureus*gruppen befanden, die alle tatsächlich aus Sommerknospen am einjährigen Holze entwickelt waren. Die Bezeichnung *Purpureusgruppen* muss deshalb gebraucht werden, weil sich ergab, daß die Rückschlagserscheinung zwar einen besonders stark entwickelten, daneben aber einige weniger kräftig gewachsene Zweige von *Purpureus* geliefert hatte, welche aus Knospen entstanden waren in den Blattachseln von bezüglich einander entfernt gestellter Blätter des nämlichen Zweiges. Zwischen diesen *Purpureus*knospen war auch ein Rindenstrich von *Purpureus*gewebe nachweisbar, so daß dieselben zu e i n e m Komplexe gehörten und alle zusammen auf einen einzelnen Variationsvorgang zurückzuführen waren. Auf dem gleichen Hauptzweige, neben und oberhalb der *Purpureus*knospen, waren *Adami*knospen sichtbar, aus deren Stellung hervorging, daß nur ein relativ kleiner, stark in die Längsrichtung ausgewachsener Teil der Sproßachse zu *Purpureus* geworden war. Das ganze Verhalten ist also ähnlich dem früher für die Entstehung von *Laburnum* aus *Adami* beschriebenen, wo alles jedoch viel übersichtlicher ist wegen der Leichtigkeit, womit man Blätter und Sproßrinde von *Laburnum* an der seidenglänzenden Behaarung erkennen kann, welche sowohl bei *Adami* wie bei *Purpureus* gänzlich fehlt.

Wie gesagt, stellte sich heraus, daß das gleiche Verhalten in allen vier beobachteten Fällen obwaltete, und es wurde dadurch möglich, vermittelst eines geeigneten Schnittes, wodurch alle benachbarten *Adami*zweige entfernt und die schwächeren *Purpureus*sprosse gefördert wurden, auch die letzteren zur Weiterentwicklung zu bringen, wodurch noch bis in 1904 die Erscheinung der gruppenweisen Entstehung deutlich hervortrat; von da an hat aber der kräftigste *Purpureus*sproß stark überhand genommen, sich aus der Basis reichlich verzweigt und die niedriger gestellten Schwächlinge zum Sterben gebracht.

---

[1]) Verh. Akad. v. Wetensch. Amsterdam, 24. Oktober 1900; Botan. Zeitung 1901.

Die variierten Knospen waren in den hier betrachteten Fällen, wie gesagt, aus Sommerknospen am Frühlingsholz entwickelt, die *Purpureus*zweige waren also als Johannissprosse aufzufassen. Doch will ich hier sofort hinzufügen, dass ich seitdem noch drei weitere Fälle von *Purpureus*bildung beobachtet habe, welche sich auf Winterknospen bezogen, und wovon ich bei zweien mit Sicherheit feststellen konnte, daß die variierten Knospen *Adami*zweige erzeugten, welche einige voneinander entfernte *Purpureus*sprosse trugen, neben welchen normale Blätter und Knospen von *Adami* saßen; auch hier waren alle *Purpureus*sprosse auf einen einzelnen zu *Purpureus* gehörigen Rindenstreifen eingepflanzt, welcher sozusagen inselartig allseitig durch *Adami*rinde eingeschlossen war.

Ein ebensolcher aus einer Winterknospe hervorgegangener *Purpureus*variant ist in Fig. 1 dargestellt. Hier sieht man den *Purpureus*streifen *ps*, durch eine Schattierung angegeben, während die *Adami*rinde weiß gelassen ist. Die Enden des Streifens sind bei *a* und *b* zu suchen. Bezüglich des Oberendes *b* war kein Zweifel; ob *a* sich ganz am Unterende des Zweiges befand oder etwas höher, konnte nicht sichergestellt werden; ersteres ist wahrscheinlich.

Aus dieser Beschreibung geht also hervor, daß der Akt des Variationsvorganges im gleichen Sommer stattfindet, in dem der Schnitt ausgeführt wird, wobei das Resultat aber früher oder später sichtbar werden kann, je nachdem die variierte Knospe noch im gleichen Sommer auswächst und vielleicht selbst Johannissprosse erzeugt, wie in dem in Fig. 1 dargestellten Falle, oder als geschlossene Knospe überwintert.

Bezüglich der Stellung der variierenden Knospen am ganzen Baume hat sich herausgestellt, daß die *Purpureus*varianten nur sehr selten aus ruhenden Knospen am alten Holze entstehen, was eben für *Laburnum* Regel ist, während umgekehrt *Laburnum* nur selten am einjährigen Holze entsteht, wo eben *Purpureus* vorzugsweise auftritt.

In bezug auf die Gestalt des variierten Sektors der *Adami*knospen muß noch folgendes bemerkt werden.

Eigentlich ist das Wort Sektor nicht ganz richtig gewählt, denn die Begrenzung des Gewebes, welches in einen der Komponenten zurückgeschlagen ist, ist durchaus nicht von Radialflächen, welche durch die Knospenachse von *Adami* gehen, abgegrenzt, sondern besitzt eine unregelmäßige Umrißlinie. Eben diese Unregelmäßigkeit erscheint besonders merkwürdig, weil daraus hervorgeht, daß der morphologische Aufbau des Sprosses nicht in näherem Zusammenhang steht mit dem Variabilitätsvorgang. Dieses Verhalten wird deutlich, wenn man die Stellung der *Adami*- und *Purpureus*blätter am Zweige betrachtet. Gewöhnlich weicht diese Stellung an den normalen Sprossen nur wenig ab von $^{3}/_{8}$, so daß das achte Blatt vertikal oberhalb eines mit 0 zu bezeichnenden Ausgangsblattes steht. Es stellt sich nun heraus, daß, wenn das Blatt 0 ein auf dem *Purpureus*sektor sitzendes *Purpureus*blatt ist, nicht notwendigerweise auch das achte zu *Purpureus* gehört, sondern daß der variierte Sektor meistens eine so unregelmäßige Gestalt hat, daß das achte Blatt ein *Adami*blatt ist, während das neunte, das zehnte und vielleicht das siebente wieder zu *Purpureus* gehören können. Ganz die gleiche Bemerkung kann man bezüglich der Inflorescenzen von *Adami* machen. Die Divergenz der Blüten beträgt darin ungefähr 130° oder nahezu $^{4}/_{11}$, wobei die drei Nebenspiralen, worin die Blüten geordnet sind, deutlich hervortreten. Bei der Sektorvariation, welche bekanntlich in den Inflorescenzen öfter

vorkommt als an vegetativen Sprossen, folgt dieser Sektor nun weder der Orthostiche noch einer Parastiche, sondern zeigt auch hier unregelmäßige Gestalt.

Was die Tiefe betrifft, bis zu welcher der variierte Sektor in den Zweig hineindringt, so zeigt die Beobachtung, daß sich darüber nichts allgemeines aussagen läßt, weil diese Tiefe mit der seitlichen Ausdehnung des Sektors zusammenhängt.



Fig. 1. *Purpureus*sektor *(Ps)*, schattiert mit vier *Purpureus*zweigen *Ps*. welche zu Johannissprossen ausgewachsen sind, an einem *Adami*zweige, gezeichnet im Oktober gleich nach dem Blattfall. Der vorjährige Zweig Ad^1 zeigt bei *c* einen Wundcallus, auf dessen Rand der variierte diesjährige Sproß Ad^2 sitzt. Die *Adami*knospen stehen an der ganzen Zweiglänge. An der Spitze steht ein *Adami*langsproß, welcher sich ebenfalls als Johannissproß entwickelt hat.

Bezüglich der leichten und sicheren Erkennung der *Purpureus*sprosse am *Adami*zweig mag noch folgendes bemerkt werden. Weil die Blätter letzterer Art gewöhnlich sehr viel kleiner sind als diejenigen von *Adami,* nämlich mehr als dreimal kürzer und schmäler, macht die Unterscheidung an ausgewachsenen Sprossen meistens keine Schwierigkeit. Ganz anders aber, wenn sich die Seitenknospen, welche man zu untersuchen hat, was sehr oft vorkommt, zu Kurzsprossen oder Blattrosetten mit verkürzter

Achse entwickelt haben; die *Adami*blätter solcher Sprosse können klein bleiben und dann kann es eben schwierig werden, an einem einzelnen Blättchen oder einem Blattstücke festzustellen, ob es zu *Purpureus* oder zu *Adami* gehört. Dafür kann dann die früher beschriebene [1]) Nekrobiosereaktion verwendet werden, welche wie folgt ausgeführt wird.

Die Spitze des zu untersuchenden Blattes wird vermittelst der kleinen Flamme eines Zündhölzchens in der Weise behandelt, daß das Gewebe davon schnell und vollständig durch die ganze Dicke des Blattes abstirbt, während die Basis des Blattes vollständig unverändert und lebendig bleibt. Dabei entsteht dann in der Mitte des Blattes eine Region, welche nur mäßig erhitzt wird, so daß darin zwar das Absterben des Protoplasmas stattfindet und Dislokationen der an das Protoplasma gebundenen Körper möglich werden, während selbst leicht zersetzbare Körper, wie Enzyme unzersetzt bleiben können. Finden sich nun, was in sehr vielen Blätten der Fall ist, unter diesen in Freiheit gesetzten Stoffen solche, welche aufeinander reagieren unter Produktion eines Pigmentes, so färbt sich die nekrobiotische Region oft sehr intensiv, während ebensowohl die schnell getötete Spitze des Blattes, wie die lebend gebliebene Basis unverändert grün bleiben.

Bei diesem Versuche verhalten sich die Blätter von *C. laburnum, C. Adami* und *C. purpureus* auf eine grundverschiedene Weise; das *Laburnum*blatt zeigt bei der Nekrobiose keine Veränderung [2]), das *Purpureus*blatt wird dadurch tief schwarz [3]) und zwar momentan, das *Adami*blatt zeigt erst nach mehreren Minuten in der nekrobiotischen Region eine Braunfärbung. Hierdurch ist es möglich, sofort *Purpureus* zu erkennen, selbst wenn nur Blättchen oder Blattstücke von einem Zentimeter oder noch weniger vorliegen.

Die Reaktion wird besonders wichtig in den seltenen, jedoch interessanten Fällen, wenn ein und dasselbe Blatt zum Teil aus *Purpureus,* teils aus *Adami* besteht. Solche „gemischte" Blätter finden sich nämlich dann, wenn sie an der Grenze des variierten Sektors inseriert sind, so daß sie bei der Entwicklung die beiden Komponenten in sich aufnehmen mußten [4]).

In der Figur 2 (siehe S. 309) ist in *a* ein solches »gemischtes« Blatt dargestellt. Das Mittelblättchen besteht an der Basis links aus *Purpureus,* oberhalb der punktierten Linie *ps* und zur rechten Hälfte aus Adami. Die durch Punktierung angegebene Trennungslinie zwischen *Purpureus* und *Adami* kann über die ganze Länge des Blattstiels verfolgt werden, das linke Seitenblättchen ist also rein *Purpureus,* das rechte Seitenblättchen rein *Adami.* Von allen drei Blättchen wurden die Spitzen erhitzt und getötet, die Basis lebendig gelassen. Alles nekrobiotische Gewebe, welches

---

[1]) Kon. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam, 30. Sept. 1899, S. 91, 30. Juni 1900 S. 74.

[2]) Übrigens ist *Laburnum* so leicht an der Behaarung der Blätter kenntlich, daß darüber niemals Zweifel herrschen kann.

[3]) Der Chemismus, worauf die Pigmentbildung beruht, ist noch nicht bekannt. Eine eigentliche Enzymwirkung ist dabei nicht allein das Ausschlaggebende (obschon sicher nachweisbar), sondern Sauerstoffeinwirkung auf einen phenolartigen aus dem absterbenden und permeabler werdenden Protoplasma freiwerdenden Körper dürfte jedenfalls die Hauptsache sein.

[4]) Solche »gemischte« Blätter zwischen *Adami* und *Laburnum* habe ich schon sehr viele gefunden und in den anfangs genannten Abhandlungen beschrieben.

zu *Purpureus* gehört, zeigt dabei tiefe Schwarzfärbung direkt nach dem Versuche, während beim *Adami*gewebe erst viel später die durch einen Halbschatten angegebene schwächere graue Verfärbung sichtbar wird. Im Mittelblättchen hat offenbar das *Adami*gewebe dasjenige von *Purpureus* zur Seite gedrängt und überwuchert.

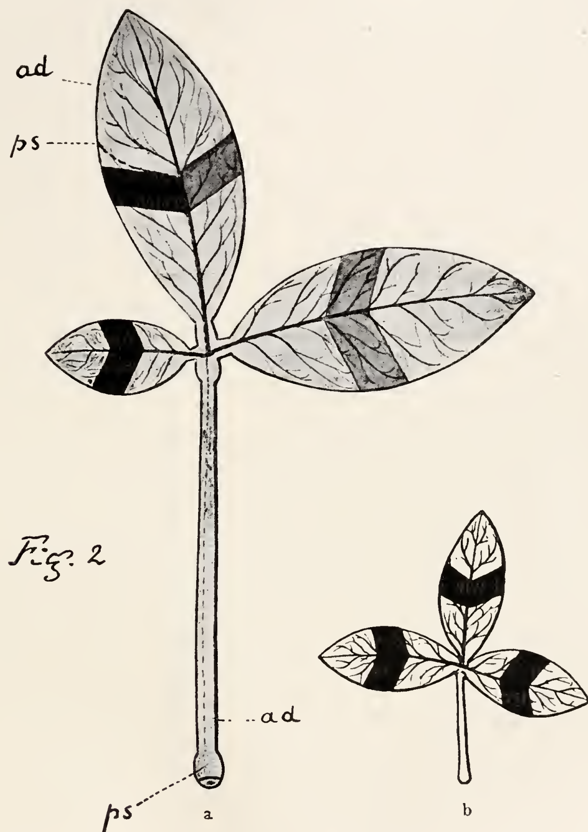


Fig. 2. Der Nekrobioseversuch mit einem *Purpureus*blatte *b* und einem gemischten Blatte *a*. Das gemischte Blatt *a* besteht links von der punktierten Linie *ps* bis ps^1 aus *Purpureus*, rechts aus *Adami* (ad—ad^1). Das Oberende der Trennungslinie geht bei *ps* quer durch das Blatt. Alle Blättchen sind an der Spitze getötet, an der Basis lebend, in der Mitte nekrobiotisch. Das nekrobiotische Band ist schwarz bei *Purpureus*, grau bei *Adami* (und unsichtbar bei *Laburnum*).

Hier ist die Stelle, um noch auf folgenden Umstand hinzuweisen.

In der Blütenregion von *Cytisus Adami* ist es nichts seltenes, daß ein Stück eines Blütenblattes durch einen auf einen Teil des Blattes lokalisiert gebliebenen Variationsakt in einen der Komponenten verändert ist. So habe ich manchmal Fahnen von *Adami*blüten gefunden, von denen ein kleines Randstück in *Laburnum* verwandelt

war; in anderen Fällen waren die Flügel zum Teile zu *Purpureus* geworden. Eine solche Veränderung kommt jedoch bei den grünen Blättern niemals vor; sind diese variiert, so ist immer auch die Achse, welche das Blatt trägt, in Mitleidenschaft gezogen, das heißt die Variation hat entweder in einem früheren Stadium stattgefunden, wie im vorigen Falle, oder eine viel umfangreichere Zellgruppe der Vegetation als die Blütenregion affiziert, welch letztere Auffassung ich für die wahrscheinlichere halte. Dieser Umstand steht in guter Übereinstimmung mit der schon früher ausgesprochenen Auffassung, die Blüte müsse als das Organ der Variabilität betrachtet werden, wofür eine Menge von Gründen der verschiedensten Art angeführt werden können.

Vergleichen wir das für die *Purpureus*bildung beschriebene Verhalten und die Erscheinungen in der Blütenregion mit den in meiner ersten Mitteilung dargestellten Erscheinungen bezüglich der Entstehung von *Laburnum,* so sieht man, daß schon eine Reihe von Fällen beobachtet sind, wo nicht eine ganze Knospe, sondern ein unregelmäßig begrenzter Teil davon in die Komponenten zurückschlägt. Bezüglich *Laburnum* kann ich noch hinzufügen, daß ich bei der Beobachtung mehrerer neuer Fälle zu dem Schlusse gekommen bin, daß dieses partielle Variieren nicht Ausnahme, sondern ganz bestimmt Regel ist, so daß man auch an bei weitem den meisten selbständigen *Laburnum*sprossen, ganz unten, also wo der Zweig an der Mutterachse festsitzt, einige Knospenschuppen oder ausgebildete Blätter von *Adami* findet[1]). Ich bin deshalb gegenwärtig überzeugt, daß sowohl bezüglich der *Purpureus-* wie der *Laburnum*bildung aus *Adami* die partielle Knospenvariation die Regel, die totale die Ausnahme ist, und ich betrachte es selbst als möglich, daß auch alle diejenigen Fälle, welche den Eindruck einer totalen Umwandlung der *Adami*knospe in eine der Komponenten machen, tatsächlich dennoch auf partieller Variation beruhen.

Eine andere und wie ich meine wichtige Beobachtung bezüglich der *Purpureus*bildung, welche ich gemacht habe, als ich mit dem vorstehend beschriebenen Verhalten bekannt geworden war, und wodurch einiges Licht auf die Ursachen geworfen wird, welche den Variationsakt veranlassen, ist folgende.

Nachdem festgestellt war, daß nicht die zu Sprossen ausgewachsenen *Purpureus*zweige selbst die ursprünglich variierten Einheiten sind, sondern daß dieselben Seitenbildungen darstellen eines variierten Teiles einer Knospenachse einer früheren Generation, erhob sich wie von selbst die Frage, welches die Stellung der variierten Knospe am Mutterzweige war, und ob sich auch irgend ein Umstand würde ausfindig machen lassen, durch welche die Variation vielleicht bedingt gewesen sein könnte. Eine genaue Untersuchung der Ansatzstelle der Sprosse, welche die Serien von *Purpureus*zweigen trugen, ergab nun das bemerkenswerte Resultat, daß diese Stelle in der unmittelbaren Nachbarschaft, — in zwei davon selbst auf dem Rande, — eines Wundcallus vorkam, gebildet durch das Zurückschneiden des einjährigen *Adami*zweiges unmittelbar oberhalb der variierten Knospe im voraufgegangenen Jahre, das ist also in dem Jahre, in welchem die variierende *Adami*knospe entstanden war, jedoch lange nach dem Augenblicke dieser Entstehung. In Übereinstimmung

---

[1]) Diese Beobachtung wird durch zwei Umstände erschwert: erstens dadurch, daß die zu *Laburnum* werdenden Knospen meistens kleine Schlafaugen sind, und zweitens dadurch, daß viele scheinbar durch Knospenvariation entstandene *Laburnum*knospen, tatsächlich Seitenknospen alter *Laburnum*kurzzweige sind.

mit meinen früheren Angaben ergibt sich also auch hier einerseits, daß der Akt der Variabilität nicht eine einzige Zelle, sondern eine ziemlich umfangreiche Zellgruppe ergriffen hat, aber außerdem, und darauf wünsche ich an dieser Stelle den besonderen Nachdruck zu legen, veranlaßt mich die Stellung der variierten Knospen in nächster Nähe einer Wunde, anzunehmen, daß der Wundreiz ein mitwirkender Faktor jenes Variabilitätsaktes gewesen ist. Allerdings ergibt sich diese Folgerung nicht als notwendiges Postulat der Beobachtung. Bedenkt man aber, wie äußerst selten die *Purpureus*knospen sind, so hat das genannte Verhalten einen so hohen Grad von Wahrscheinlichkeit, daß die Annahme, es soll die Verwundungsstelle in allen beobachteten Fällen nur ganz zufällig sich in der unmittelbaren Nachbarschaft jener *Purpureus*-knospen gefunden haben, zu verwerfen ist.

Die Einwendung, daß, wenn ein Wundreiz bei der *Purpureus*bildung mitwirke, dieser Vorgang allgemeiner sein sollte, muß folgenderweise beantwortet werden. Zunächst ist es klar, daß der Wundreiz allein die Erscheinung nicht hervorruft, sondern daß andere nicht bekannte mitwirkende Faktoren dabei ebenfalls in Betracht gezogen werden müssen. Andererseits muss wohl überlegt werden, daß das Zurückschneiden der Zweige, deren Knospen variiert sind, nicht stattgefunden hat mit der Kenntnis, daß die Stelle am Zweige, wo dieser Schnitt zustandekommt, einen so wichtigen Einfluß auf den Variationsvorgang ausüben kann, sondern daß dieser Schnitt ganz willkürlich ausgeführt ist, wobei es viel wahrscheinlicher ist, daß das Abschneiden an einer Stelle stattfindet, welche von einer Knospe so weit entfernt ist, daß diese Knospe außerhalb des Bereiches des Wundreizes verbleibt, als umgekehrt, und daß selbst dann, wenn sehr viele Zweige zurückgeschnitten werden, doch immer zu erwarten ist, daß nur vereinzelte Knospen eben am Rande eines Callus vorkommen werden. Hierbei ist übrigens die Jahreszeit, in der der Schnitt ausgeführt wird, nicht gleichgültig. Findet dieser z. B. im Frühjahre statt, so bildet sich der Callus an der freien Wundfläche selbst, während beim Sommerschnitt ein ziemlich langes Stück des Zweiges unterhalb der Wunde absterben kann, woraus folgt, daß der Wundreiz, welcher vom Rande der lebend gebliebenen Teile ausgeht, seinen Einfluß im Sommer auf eine größere Entfernung ausdehnen kann, wie im Frühjahr. Wie weit im gesunden Gewebe dieser Abstand werden kann, ist einigermaßen zu bemessen aus den Angaben, welche bezüglich der Länge der durch Wundreiz hervorgerufenen Gummikanäle beim Pfirsich und Mandelpfirsich festgestellt sind[1]) und wofür ungefähr 1 Zentimeter als obere Grenze in der Längsrichtung des Zweiges gefunden wurde. In der tangentialen Richtung erstreckt sich der Reiz weniger weit, was zur Aufstellung des Begriffes „Wundellipse" geführt hat; im gegenwärtigen Falle wo-

---

[1]) Beijerinck et Rant, Sur l'excitation par traumatisme et l'écoulement gommeux chez les *Amygdalées*. Archives Néerlandaises. Sér. 2. T. II, p. 184. 1905. Vor kurzem hat Herr Ruhland (Berichte d. deutschen Bot. Gesellschaft. Bd. 25 1907) dieser Untersuchung eine Kritik gewidmet, und er verspricht spätere Mitteilungen bezüglich der Ausdehnung des Wundreizes beim Gummifluß der *Amygdaleen*, ohne zu bemerken, daß eben das ein Hauptgegenstand unserer Untersuchung war, und das Resultat kurz aber klar auf S. 186 und 188 dargestellt ist (vgl. auch Rant, Die Gummosis der *Amygdalaceae*, Amsterdam, 1906, wo auf Seite 81 ff. auch Figuren von der Wundellipse gegeben sind.) Daß Herr Ruhland sich bezüglich der Wirkung des Sublimates als Gift für die lebende Zelle und für Enzyme Vorstellungen macht, welche gänzlich abweichen von der Wirklichkeit, möge hier nebenbei bemerkt werden.

bei es sich um Wunden handelt, welche durch das Wegschneiden von ganzen Sprossen entstehen, kann natürlich nur die Ausdehnung des Wundreizes in der Längsrichtung in Betracht kommen. Die Bildung der traumatischen Gummikanäle hat noch einen anderen darauf influierenden Umstand ans Licht gebracht, ich meine den ausschlaggebenden Einfluß, welcher die Jahreszeit, in welcher die Verwundung stattfindet, sowie die Temperatur auf den traumatischen Erfolg ausüben und welche beim verholzten Zweige darin besteht, daß im Februar und März bei ca. 18° C, also im Zimmer, eine Schnittwunde schon nach wenigen Tagen in Gummifluß gerät, während dies bei Temperaturen unterhalb 12° bis 10° C durchaus nicht geschieht. Später im Sommer, wenn die Temperatur auch im Freien 18° C geworden ist, geben ganz ähnliche Verwundungen jedoch gar keine Veranlassung zum Gummifluß, woraus deutlich hervorgeht, daß nicht allein der Wundreiz die Erscheinung beherrscht, sondern daß dafür noch überdies eine gewisse Temperatur, sowie noch nicht aufgeklärte Umstände anderer Art realisiert sein müssen. Da nun die Bildung von *Laburnum* und *Purpureus* aus *Adami* gewissermaßen der Gummifluß analoge Vorgänge sind, insoweit beide Vorgänge als die Erweckung schlummernder Eigenschaften aufzufassen sind, muß auch in beiden Fällen auf ähnliche Ursachenkomplexe geschlossen werden. Für experimentelles Eingreifen zum Zwecke der *Purpureus*bildung hat man also außer dem Wundreize, dessen Wirkung als höchst wahrscheinlich zu erachten ist, noch außerdem den physiologischen Zustand des *Adami*zweiges, sowie die Temperatur in Betracht zu ziehen, für welche beiden letzteren Einflüsse noch keine genügende experimentellen Erfahrungen vorliegen, um eine richtige Wahl derselben anzuordnen.

Wenn auch nicht bezüglich der Gummosis, welche an den älteren Ästen jedes Lebensalters in Übereinstimmung mit der Erwartung stattgefunden hat, so muß es doch als möglich betrachtet werden, daß auch das Alter der Zweige, in dem der Schnitt stattfindet, auf einen Variationsvorgang, im vorliegenden Falle also auch bei der *Purpureus*bildung, mit eingreifen kann, wodurch ein neuer und nicht wohl berechenbarer Faktor in Erwägung zu ziehen ist.

Obschon also die geschilderten Beobachtungen zu einer ersten Verbesserung bei der *Purpureus*erzeugung Veranlassung geben, nämlich zur Ausführung des Schnittes derart, daß jedesmal eine *Adami*knospe neben oder auf dem Wundrande zu sitzen kommt, wodurch die Chancen für die *Purpureus*bildung wahrscheinlich verbessert werden, so wird dadurch jedoch noch keineswegs auf ein gesichertes Resultat gerechnet werden können. Der Fortschritt auf diesem Gebiete wird nur ein langsamer sein können, weil die Versuche zwei Jahre umfassen, ehe ein vollständiger Überblick zu erhalten ist, und überdies sehr viele derselben aus allerlei mechanischen und zufälligen Gründen fehlschlagen müssen.

Die Erscheinung der Flockenbildung oder Agglutination bei Alkoholhefen[1]).

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, II. Abteilung, XX. Band, 1908, S. 137—157.

Sofort nachdem das Reinzuchtverfahren auf Preßhefe angewandt wurde, stellte es sich heraus, daß die Reinhefe beim Heruntersinken nicht flockt oder agglutiniert, wie das bei roh kultivierter Hefe immer mehr oder weniger deutlich stattfindet, und daß letztere Hefe eine kürzere Zeit zum Absetzen braucht wie erstere.

Die Ursache dieser in mehreren Richtungen wichtigen Erscheinung beruht auf zwei gänzlich verschiedenen Umständen, nämlich erstens auf der Existenz von gewissen, in der rohen Preßhefe nicht seltenen Hefearten, welche, an und für sich, also auch in Reinzucht das Vermögen besitzen, stark zu flocken, gerade also wie die Unterhefe, wovon sie jedoch gänzlich verschieden sind, weil sie, wie die Preßhefe selbst, sich als Oberhefen herausstellen (Autoagglutination), und zweitens darauf, daß einige Bakterienarten, welche zu den aktiven Milchsäurefermenten gehören, die Eigenschaft haben, die an und für sich nicht flockenden Hefearten zur Flockung zu bringen (symbiotische Agglutination).

1. *Die autoagglutinierenden Hefen.*

Bezüglich der Autoagglutination mag folgendes bemerkt werden:

Eine starke Autoagglutination zeigt die gewöhnliche Unterhefe der Bierbrauereien, welche eben wohl durch diese Eigenschaft ihren Namen bekommen hat, während die Braueroberhefe ohne Bakterien nicht agglutiniert, und worauf ein in § 4 beschriebenes einfaches Verfahren zu basieren ist, um beide nebeneinander ziemlich genau quantitativ zu bestimmen. Ferner kommt diese Erscheinung vor bei einer in Preßhefe nicht seltenen besonderen Maltosehefe, welche schon von Pasteur entdeckt und beschrieben ist unter dem Namen »levûre caséuse«[2]) und wofür ich den Namen *Saccharomyces curvatus* vorschlage, wegen der gekrümmten Gestalt derjenigen Zellen, welche beim Plattenverfahren sich verlängern, während die kürzeren Zellen nicht von Preßhefen zu unterscheiden sind. Auch sind die Kolonieen auf Würzeplatten bei dieser Art am Rande eigentümlich aufgebogen, wodurch dieselbe oft in einem

---

[1]) Die Worte »Flockenbildung« und »Agglutination« werden im folgenden als Synonyme gebraucht, doch muß bemerkt werden, daß es sich hierbei um Vorgänge handelt, welche von der Agglutination beweglicher Bakterien verschieden sind, obschon in allen Fällen der auf irgend eine Weise erzeugte, den Mikroben anhaftende Schleim als nächste Ursache anzunehmen ist.

[2]) Études sur la bière. 1896. p. 196.

Gemische leicht erkenntlich ist. Da sie beinahe ebenso kräftig gärt und wächst, wie die Preßhefe selbst, und sich während und nach der Gärung mit erstaunlicher Schnelligkeit und Vollkommenheit absetzt, verdient diese Art die besondere Aufmerksamkeit der Physiologen.

Sie bildet einen Teil der gewöhnlichen Bäckerhefe, doch findet sie sich darin so selten, daß die Isolierung ohne eine vorläufige Anhäufung nicht gelingt. Diese Anhäufung kann, wenigstens für die holländische Preßhefe, soweit nach dem alten Wiener Verfahren gearbeitet wird, auf folgenden Umstand gegründet werden: Die Curvatus-Hefe ist gegenüber excessiven oder schädlichen Bedingungen weniger empfindlich wie die Preßhefe selbst.

Als solche Bedingungen können nun besonders folgende praktisch verwendet werden: Erhitzung, Thermokultur, Fäulnis und langes Aufbewahren, und Einwirkung von giftigen Dünsten, wie von Aether, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Alkohol etc. Alle diese Umstände können bei richtiger Anwendung eine relative Vermehrung der *Curvatus*-Hefe gegenüber der Preßhefe herbeiführen. Als Beispiel will ich das Fäulnisverfahren etwas näher besprechen. Gewöhnliche Preßhefe wird unter einer Glasglocke, um die Verdunstung einzuschränken, im erwärmten Zimmer einfach der sauren Verderbnis überlassen. Es entstehen dabei massenhaft Milchsäurefermente und meistens auch *Mycoderma*. Die Preßhefezellen sterben dagegen schnell ab. Es wird nun etwas von diesem Material in angesäuerter Würze bei 38° C und mit partiellem Luftabschluß ausgesät, damit *Mycoderma* zurücktreten und *S. curvatus* sich anreichern soll.

Weil diese Hefe schnell und leicht zu Boden sinkt, sammelt man etwas von dem Präzipitat und macht davon eine Reinkultur auf einer Würzeagar- oder Würzegelatineplatte, wobei die nun zahlreich vorhandenen Kolonieen sich leicht zwischen den übrigen Arten erkennen und aufheben lassen. Weil die Agglutinierung der Würzekulturen eine sehr vollkommene ist, und noch kräftiger sein kann als die durch Milchsäurefermente bewirkte Agglutinierung der gewöhnlichen Preß- und Bierhefe, ist die ganze Erscheinung eine höchst auffallende und interessante, welche sich gut für einen Vorlesungsversuch eignet.

Obschon das Absetzen so schnell und vollständig stattfindet, daß es sich als eine technisch brauchbare Eigenschaft herausstellt, konnte in Versuchen in grösserem Maßstabe die *Curvatus*-Hefe die Preßhefe nie völlig ersetzen, weil ihre Triebkraft, sich wenigstens in Brotteig, als etwas niedriger ergab, vielleicht weil die Verteilung derselben in der zähen Masse auf Schwierigkeiten stößt. Andererseits vergärt diese Hefe Maltose und Saccharose bei Laboratoriumsversuchen nahezu mit gleicher Intensität wie Bier- und Preßhefe.

Daß langes Aufbewahren von Preßhefe zu einer relativen Anhäufung der *Curvatus*hefen führen kann, ergibt sich schon aus dem Umstande, daß im Schlamme des Stadtgrabens zu Delft relativ leicht *Curvatus*-Hefe zu finden ist; und daß auch die Methode der Thermokultur, d. h. das Kultivieren bei oder oberhalb dem Temperaturmaximum der Preßhefe, zur Anreicherung der mehr thermophilen Hefen zum Hervortreten von *S. curvatus* Veranlassung geben kann, hat sich bei vielen Kulturversuchen gezeigt, welche mit Preßhefen verschiedener Herkunft ausgeführt sind, und wobei auch noch andere charakteristische Hefen entdeckt wurden, worüber jedoch erst später zu berichten ist.

Die Einwirkung von flüchtigen Giften läßt sich am besten wie folgt feststellen: Es werden in einer Glasdose nebeneinander aufgestellt eine kleine Schale mit der zu untersuchenden Hefe in dickbreiigem Zustande, und eine zweite Schale mit dem leicht verdunstenden Stoff. Der Dampf verbreitet sich durch den Raum und es findet nun ein Absterben der verschiedenen Mikrobenarten statt, in der Reihenfolge ihrer Empfindlichkeit dem gewählten Gifte gegenüber, welche Reihenfolge durchaus nicht die nämliche ist für die verschiedenen Körper. Es kamen zur Untersuchung Toluol, Schwefelkohlenstoff, Äther, Chloroform, Alkohol, Ammon und Salzsäure, welche bei der Einwirkung auf Preßhefe schließlich nur die sporenbildenden Bakterien lebendig zurückließen. Die Untersuchung geschieht durch zahlreiche Prisen, welche dem Hefebrei mit dem Platinfaden nach bestimmten Zeitintervallen entnommen werden und auf Würzegelatineplatten ausgesät werden. Werden diese richtig gewählt, so läßt sich zeigen, daß die autoagglutinierende *Curvatus*-Hefe sich unter dem Einfluß der Dämpfe in holländischer Bäckerhefe relativ anhäuft, nachdem die eigentliche Preßhefe schon größtenteils abgestorben ist.

In dritter Linie habe ich hier als autoagglutinierend zu verzeichnen eine eigene Varietät der gewöhnlichen Preßhefe selbst, welche darin früher nicht gefunden wurde, jedoch, seitdem man bei den Preßhefefabriken das Lufthefeverfahren einführte, ein nicht gerade seltener Komponent davon geworden ist. Außer der Agglutination sowie einem etwas geringeren Vergärungsgrad (wohl infolge der schwierigeren gleichmäßigen Verteilung in der Würze) konnte ich keine Verschiedenheiten hinsichtlich dieser Hefe und der Preßhefe auffinden.

Als weitere sehr eigentümliche, selbstagglutinierende Art muß eine Saccharosehefe angeführt werden, welche weder Maltose noch Laktose vergärt, die als Verunreinigung von Lufthefe isoliert wurde und in meinem Laboratorium *Saccharomyces muciparus* genannt wird. Diese Art ist nahe verwandt mit der früher kurz beschriebenen *Saccharomyces fragans,* einer nicht agglutinierenden, leicht kenntlichen Art, welche als stetiger Bewohner des Sauergutes sofort die Aufmerksamkeit auf sich zieht, dadurch, daß dieselbe (mit einer nahe verwandten Art *S. disporus* [1])) die hohen Temperaturen des Säuerungsverfahrens bei der Herstellung des Sauergutes, ohne abzusterben, vertragen kann, während dabei die Preßhefe selbst, die Weinhefe, die Monilien, die Chalaren, die Oidien und die Dematien ausnahmslos absterben und nur gewisse Mykodermen noch mit am Leben bleiben, welche letztere dem erfahrenen Forscher jedoch niemals Sorge machen. Ich erwähne diese verwandtschaftliche Beziehung der Muciparus-Hefe mit *S. fragans* deshalb speziell, weil ich vermute, dass auch erstere Art wohl in Sauerguten vorkommen wird, obschon ich dieselbe darin noch nicht auffand, sondern, wie gesagt, nur in der Lufthefe.

Diese Hefe ist bemerkenswert durch ihre eigentümliche Variabilität; man kann beinahe sagen durch ihre Pleomorphie. Man findet nämlich, daß alte Gelatinekulturen sich regelmäßig in zwei durchaus verschiedene Formen spalten, nämlich in eine Form mit runden und elliptischen Zellen, welche mit der Hauptform identisch ist, und eine zweite, welche aus wahren Mycelfäden besteht. Übrigens stimmen diese beiden Formen in physiologischer Hinsicht nahe überein. Dennoch kann man sich

---

[1]) Diese sehr verbreitete und eigentümliche Hefe wurde vom chemischen Ingenieur Herrn N. L. Swart entdeckt.

kaum zwei Hefearten denken, welche mehr voneinander verschieden wären, als Hauptform und Variante eben dieser Art. Sporenbildung ist ziemlich selten beobachtet, vielleicht nur deshalb, weil das früher beschriebene Verfahren [1]), um die Sporen erzeugenden Individuen anzuhäufen, hier noch nicht angewandt wurde.

Muciparus gehört zu den kleineren Hefen, und deren elliptische Hauptform mißt ca. 4—6 μ, während der mycelartige Variant zwar sehr lang wird, meistens jedoch dünn bleibt, und bei schlechten Ernährungsverhältnissen so dünn wie Fadenbakterien werden kann.

Mit dieser kurzen Übersicht schließe ich die Betrachtung der selbstflockenden Hefen und gehe über zur Besprechung der Erscheinung als Bakterienwirkung.

2. *Hefeagglutination durch Symbiose mit Lactococcus.*

Herr Barendrecht ist der erste gewesen, welcher eine hefeflockende Bakterie unter dem Namen *Leuconostoc agglutinans* beschrieben hat [2]). Außer dieser gibt es noch mehrere andere agglutinierende Bakterien. Alle diese gehören zu den aktiven Milchsäurefermenten [3]) der Gärungsindustrie, und können in die »physiologischen Gattungen« *Lactococcus* und *Lactobacillus* untergebracht werden, wobei dann der Name *Leuconostoc agglutinans* in *Lactococcus agglutinans* zu verwandeln ist, weil es sich hier um ein *Streptococcus*-artiges Milchsäureferment handelt, welches mit den gewöhnlichen Laktokokken der Milchwirtschaft unzweifelhaft verwandt, obschon davon verschieden ist, und z. B. aus Maltose viel mehr Säure erzeugt.

Lactococcus agglutinans, welcher in verschiedenen Varietäten vorkommt, kann leicht aus Lufthefe isoliert werden, worin diese Art in genügender Anzahl vorkommt, um in Kolonieenkulturen von Lufthefe auf Würzeplatten, welche bei 23° C kultivert sind, sofort als kleine, ziemlich fest zusammenhängende mehr trockene als schleimige Kolonieen zwischen den Hefen erkannt zu werden.

Hat man keine Lufthefe zur Verfügung, sondern nur gewöhnliche Handelshefe, so ist es besser, ein Anreicherungsverfahren vorhergehen zu lassen.

Eine wissenschaftliche Anhäufung erfordert aber, daß man bekannt ist mit den Gruppeneigenschaften der anzuhäufenden Formen. Diese sind im vorliegenden Falle sofort anzugeben, wenn man weiß, daß unsere Bakterie zu den aktiven Milchsäurefermenten gehört. Diese Fermente nun haben die folgenden allgemeinen Eigenschaften: Sie können anaërob wachsen und dennoch meistens (nicht immer) durch aërobe Plattenkulturen isoliert werden. Sie verwenden Zucker als Kohlenstoffquelle und Pepton als Stickstoffnahrung und die optimale Wachstumstemperatur liegt für *Lactococcus* bei ca. 30° C. Dadurch kommt man leicht zu folgendem einfachen Anhäufungsverfahren: Eine gewöhnliche Stöpselflasche wird gänzlich mit durch Kochen luftfrei gemachter Würze angefüllt, mit roher Preßhefe infiziert und im Thermostaten bei 30° C kultiviert. Schon nach 24 Stunden zeigt sich eine ziemlich starke Alkoholgärung und aus der Flüssigkeit sieht man beim Stehen schwach agglutinierte Hefe nach

---

[1]) Regeneration der Sporenbildung bei Alkoholhefen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. IV. 1898. p. 658).

[2]) Dieses Blatt. Bd. VII. 1901. p. 623.

[3]) Essigbakterien, welche Hefe agglutinieren, gibt es nicht.

und nach untersinken. Die gewöhnlichen Verunreinigungen der Hefe, wie *Mycoderma* und die Essigbakterien, sind durch diese erstere Kultur schon vollständig beseitigt, die aktiven Alkoholhefen jedoch noch nicht genügend. Um auch letzteres zu erreichen, wird ein Tropfen der ersten Kulturflasche in eine neue, der ersten gleiche Flasche übergeimpft und wieder bei 30° kultiviert. Nun verschwindet die Preßhefe beinahe oder gänzlich, und zwar bekommt man eine schwache, von Milchsäurefermenten hervorgerufene Kohlensäureentwicklung [1]), zugleich mit einer starken Milchsäurebildung, welche in Würze von 12 Saccharometergraden in 3 Tagen 12—15 ccm pro 100 ccm betragen kann.

Wird nun hiervon auf eine Würzeagarplatte ausgesät, so entwickelt sich nach weiteren 24 Stunden bei 30° C eine Kultur von verschiedenen Milchsäurefermenten, worunter sich *Lactococcus agglutinans* in großer oder sehr großer Anzahl vorfindet und sich leicht abheben läßt, indem die Kolonieen etwas schleimig sind und in einem Stücke am Platinfaden hängen bleiben. Weil diese Eigenschaft der Schleimbildung jedoch leicht verloren gehen kann, muß man, im Falle keine schleimigen Kolonieen gefunden werden, einfach gut entwickelte Streptokokkenkolonieen wählen. Die bei diesem Versuche meistens zu gleicher Zeit auftretenden Lactobacillen agglutinieren nach meiner bisherigen Erfahrung nicht; um solche zu erhalten, muß ein anderer Weg befolgt werden, worauf ich unten zurückkomme. Hier muß noch speziell darauf hingewiesen werden, daß für die Flaschenkultur die Temperatur von ca. 30° ganz essentiell ist, wird diese nicht eingehalten, sondern durch 40° C ersetzt, so wird *Lactococcus agglutinans* vollständig verdrängt durch das gewöhnliche Milchsäureferment der Gärungsindustrie, nämlich durch *Lactobacillus fermentum* oder dessen abgeleitete Form, *L. Delbrücki*, welche durchaus nicht zur Hefeagglutination Veranlassung geben.

Es braucht kaum gesagt zu werden, daß andere Materialien als Preßhefe, z. B. die verschiedenen Grundstoffe oder Flüssigkeiten der Gärungsgewerbe, Milch, Gartenerde, Früchte u. s. w., auf dieselbe Weise für Anhäufungsversuche der agglutinierenden Kokken verwendet werden können, wie die Preßhefe selbst. Man kommt dabei zu dem Resultate, daß diese Mikroben keine weitere Verbreitung besitzen und am sichersten, außer aus Hefe, aus gärenden Würzen der verschiedensten Herkunft isoliert werden können.

Nimmt man den Namen *Lactococcus agglutinans* in der weitesten, man könnte sagen Linnéschen Speciesfassung, so gehören dazu alle in Würze viel Milchsäure produzierenden Lactokokken, welche wohl mit Maltose, aber nicht mit Milchzucker wachsen und sich deshalb in Milch nicht entwickeln. Dennoch ist nicht daran zu zweifeln, daß sie mit den gewöhnlichen Kokken der Milch- und Rahmsäuerung, nämlich *Lactococcus lactis,* sowie mit dem Fermente der „lange Wei", *Lactococcus hollandicus,* nahe verwandt sind.

Eine sehr wichtige Eigenschaft von *L. agglutinans* besteht darin, daß beim

[1]) Merkwürdigerweise handelt es sich hierbei um eine Alkoholgärung, so daß diese Milchsäurefermente zugleich Alkoholfermente sind. Auf diesen Umstand wird später mit analytischen Belegen zurückgekommen werden, und zwar in Verbindung mit der Mannitbildung aus Lävulose, welcher Vorgang für die Milchsäurefermente ebenfalls charakteristisch ist.

Aufbewahren der Kulturen auf Würzeagar bei Luftzutritt das Vermögen, Hefe zu agglutinieren, nach einigen Wochen verloren geht, bei Zimmertemperatur z. B. schon nach 3 Wochen oder bei gewissen Varietäten nach ein paar Monaten. Äußerlich haben die Kolonieen sich dabei nicht abgeändert und auch die Säurebildung kann ungeschwächt sein, nur bemerkt man, daß die schleimbildenden Varietäten, deren Kolonieen von den Platten leicht in einem Stücke entfernt werden können, auch diese Eigenschaft verloren haben und ganz weich und halbflüssig fortwachsen, wodurch sie große Analogie mit dem *Lactococcus hollandicus* zeigen, welcher ebenfalls sehr leicht das Vermögen der Schleimbildung verliert. Auch die Ursache des Verlustes ist in beiden Fällen dieselbe, nämlich Kultur bei zu hoher Temperatur und bei zu reichlicher Lüftung. Schränkt man den Luftzutritt und die Wärme genügend ein, z. B. durch Kultur im Keller in geschlossenen, gänzlich angefüllten Flaschen, so bleibt das Agglutinierungsvermögen unverändert fortbestehen, eben wie das Vermögen der Schleimbildung bei der „lange Wei", weshalb einiger Grund vorliegt, die Agglutinierung auf Schleimbildung seitens der Bakterien zurückzuführen. Weil aber manche Hefe stark agglutinierende Bakterien ganz weiche Kolonieen erzeugen und niemals als fadenziehende Kulturen erhalten werden, muß dann auch geschlossen werden, daß in letzterem Falle die Schleimbildung ebensosehr unter dem Einfluß der Hefe steht, wie unter dem der Bakterie selbst.

Ein anderes und sehr einfaches Verfahren, um *L. agglutinans,* vor dem Verlust des Agglutinationsvermögens zu schützen, besteht darin, daß man die Kulturen auf Würzeagar an der Luft zusammen mit reinkultivierter Preßhefe aufbewahrt, das Gemisch beider Mikroben auch als solches überimpft, und zwar auf die gewöhnliche Weise als Kulturen in Reagenzröhrchen. Schon jetzt weiß ich, daß bei diesem Verfahren, wenigstens während eines ganzen Jahres (ich vermute auch viel länger), keine Verminderung des Agglutinationsvermögens stattzufinden braucht.

In dieser Beziehung mag noch folgendes bemerkt werden:

Das Verhalten von *L. agglutinans* zur Preßhefe ist ein sehr bemerkenswertes, auch bei der symbiotischen Kultur beider Mikroben auf festem Boden, wo von Agglutination natürlich keine Rede sein kann. Es stellt sich nämlich heraus, daß unsere Bakterie mit ganz auffallender Leichtigkeit durch die wachsenden Hefekolonieen selber fortwächst (beweglich sind die Milchsäurefermente niemals), so daß man nur selten halb mit *L. agglutinans* infizierte Hefekolonieen antrifft, wie das bei Essigbakterien und anderen Milchsäurefermenten, welche bei Aussaaten von Rohhefen mit auf den Platten wachsen, so oft vorkommt, sondern gewöhnlich überall in der Kolonie auch die Bakterie findet. Merkwürdiger noch wird dieser Umstand dadurch, daß man in manchen Fällen die mit *L. agglutinans* zufällig infizierten Kolonieen sofort erkennen kann an ihrer stark ausgeprägten und sehr frühzeitig sichtbar werdenden gekräuselten Oberfläche, wodurch es bisweilen möglich ist, z. B. aus Lufthefe, welche als Streukultur auf Würzeagarplatten ausgesät ist, beide Symbionten zusammen abzuheben und weiter zu kultiveren. Es muß hier besonders betont werden, daß dieses Verfahren nur gelingt bei der Verwendung von Agarboden, und auf Gelatineplatten kein Resultat geben kann, weil darauf die Erscheinung viel weniger deutlich ist. Die Kräuselung solcher Kolonieen beruht in erster Linie auf einer ungewöhnlichen Länge, welche die Hefezellen erreichen und welche Veranlassung gibt zum Unregelmäßigwerden der Oberfläche infolge der schwierigeren Verschiebung länglicher wie runder

Körper, welche einander seitlich drücken. Zwar kräuseln die Kolonieen der Preßhefe sich bekanntlich immer, wenn sie alt werden, hier gibt es jedoch eine Kräuselung der symbiotischen Kolonieen zu einer Zeit, wenn die reinen, auf Würzeagar wachsenden Hefekolonieen noch ganz glatt und feuchtglänzend sind. Handelt es sich um eine starke Agglutination verursachende *Lactococcus*-Varietät, so kann die Erscheinung sehr auffallend werden, und darum ein schönes Beispiel abgeben für makroskopische und mikroskopische Formveränderung eines Lebewesens durch Zusammenwachsen mit einem anderen. Zu gleicher Zeit liegt darin ein gutes Merkmal, um stark agglutinierende Formen unserer Bakterie zu erhalten, obschon bemerkt werden muß, daß die Kräuselungserscheinung auch bei vielen Hefekolonieen, welche ganz rein sind, so ausgeprägt hervortreten kann, daß dadurch vollkommene Nachahmung der mit *Agglutinans* infizierten Kolonieen entsteht.

Die Erklärung der Kräuselung infolge der Symbiose dürfte vielleicht darin bestehen, daß *L. agglutinans* die Wand der Hefezellen einigermaßen angreift, teilweise in Schleim überführt und so zu einem Dünnerwerden derselben Veranlassung gibt. Bei gleichem Turgordruck werden solche Zellen leichter wachsen, und wenn ihre Enden mehr nachgeben, wird ihre Mitte sich dabei verlängern. Wie diese Erweichung jedoch geschieht, ist noch nicht aufgeklärt, vielleicht durch ein unbekanntes, durch *L. agglutinans* erzeugtes Enzym; sicher ist, daß Säurebildung dafür nicht ausreicht, denn einerseits läßt sich durch künstliche Zufügung von Säure nichts Besonderes erreichen und andererseits gibt es Milchsäurefermente, welche noch mehr Säure wie *L. agglutinans* erzeugen, und dennoch bei der Symbiose mit Preßhefe die Koloniestruktur nicht abändern.

Da *L. agglutinans* viele Hefezellen zum langsamen Absterben bringt, verflüssigen Hefekolonieen und Striche, welche mit *L. agglutinans* infiziert sind, die Würzegelatine, worauf sie wachsen, sehr viel früher wie die nicht infizierten. Dieses ist also ganz in Übereinstimmung mit der früher von mir angebenen Tatsache, daß die Proteolyse durch Alkoholhefe ein nekrobiotischer Vorgang ist.

Alle untersuchten Alkoholhefen werden durch unsere Bakterie mehr oder weniger vollkommen agglutiniert, so außer der Preßhefe die Oberhefe der Brauereien, die Weinhefen, *Saccharomyces fragrans, S. apiculatus, S. Ludwigi, Schizosaccharomyces Pombe.*

3. *Agglutinierende Lactobacillen.*

Es wurde schon gesagt, daß es auch Arten von *Lactobacillus* gibt, welche Hefeagglutination hervorrufen können. Man kann dieselben auf verschiedene Weise erhalten, besonders dadurch, daß man Preßhefe in einem warmen Zimmer verderben läßt, wobei bekanntlich einige Lactobacillen als aktive Verderbnismikroben auftreten. Um diese zu isolieren, bringt man die verdorbene Hefe bei Luftabschluß in eine gänzlich mit Würze angefüllte Stöpselflasche, welche man dann in den Thermostaten stellt. Kultiviert man bei 37° oder höher, so entwickeln sich neben *Lactobacillus fermentum* und *L. Delbrücki* noch andere Arten, wovon eine bei der Aussaat der Rohkultur aus der Flasche auf Würzeagar zwischen den vielen Kolonieen letztgenannter Art leicht aufzufinden ist durch die eigentümliche, dichte, nicht schleimige Konsistenz der Kolonieen, welche in ihrer Mitte etwas vertieft, am Rande nach oben

gebogen sind. Diese bestehen aus kurzen rechten Stäbchen, und bei der Kultur in Würze zusammen mit Preß-, Bier- oder Weinhefe geben sie zu starker Agglutination Veranlassung. Man kann die Art auch ziemlich viel in gärenden Preßhefenmaischen finden, und wegen der eigentümlichen Konsistenz der Kolonieen nannte ich dieselbe *Lactobacillus densus.*

Infiziert man eine mit Würze gänzlich angefüllte Stöpselflasche wie vorgehend mit verdorbener Preßhefe und kultiviert bei 33°, anstatt bei 37°, so erhält man neben wenig *Lactococcus agglutinans,* welcher bei dieser hohen Temperatur zu degenerieren anfängt, zwar ebenfalls ein Gemisch von verschiedenen *Lactobacillen,* aber in dieser ersten Rohkultur ist *L. fermentum* nicht mehr Hauptform; Reinkulturen auf Würzeagarplatten zeigen, daß dabei, neben *L. densus,* oft eine höchst eigentümliche Art, welche ich schon früher als *Lactobacillus conglomeratus* beschrieben habe, die Hauptrolle spielen kann, wenn sie auch nicht immer gegenwärtig ist [1]). Diese Art ist leicht kenntlich durch den eigentümlichen säuerlich-widerlichen Geruch ihrer Kulturen in Würze und an der höchst eigentümlichen Form, welche die Stäbchen, bei hohen Temperaturen und starker Lüftung kultiviert, annehmen. Kolonien auf Würzeagar bei 40° C bestehen nämlich aus Klumpen so wunderlich in- und aneinandergestellter Stäbchen, Kokken und Fäden, daß man kaum meint, eine Bakterienkultur vor sich zu sehen, was eben zur Aufstellung des Artnamens veranlaßte. Bei niederen Temperaturen zeigen die Kulturen in Würze die Form gewöhnlicher Stäbchen und Fäden, wie die anderen Lactobacillenarten, mit denen sie auch durch die beträchtlich intensive Milchsäurebildung übereinstimmt.

Für den gegenwärtigen Zweck ist diese Art von besonderem Interesse, weil das Agglutinationsvermögen derselben bezüglich aller untersuchten Hefearten sehr stark ausgebildet ist, und ihre Reinkulturen in Würze an und für sich ebenfalls eine kräftige Agglutination anzeigen, durch welche letztere Eigenschaft sie unter den mir bekannten Lactobacillenarten einzig dasteht. Weil sie überdies, in Würze, in geschlossener Flasche kultiviert, zu einer ziemlich kräftigen Kohlensäureentwicklung Veranlassung gibt, gehört dieselbe zu den gut charakterisierten Formen.

Obgleich ein Stamm dieser Art schon mehrere Jahre in Reinkulturen auf Würzeagar fortgeimpft wurde, hat derselbe das Agglutinationsvermögen unverändert beibehalten, abweichend also von den so variablen Laktokokken. Doch geht das Vermögen der Kohlensäurebildung schließlich verloren.

Keine andere Art ist so sehr wie diese zu empfehlen für Vorlesungsversuche über Hefeagglutination. Solche, wie überhaupt alle auf Agglutination bezüglichen Versuche werden am einfachsten mit gewöhnlichen, mit Wattepfropfen geschlossenen und zu einem Drittel oder Viertel mit Würze von 10° B. gefüllten Reagenzröhren vorgenommen, worin die reinkultivierten Hefen samt den agglutinierenden Fermenten

---

[1]) Ein niemals fehlendes Anhäufungsverfahren für diese Art, welche in verfaulter Hefe so allgemein ist, kann ich noch nicht geben, doch glaube ich, daß jemand, der sich mit den verschiedenen Versuchen, welche auf Lactobacillen führen, genügend vertraut gemacht hat, wohl die richtige Spur finden wird, um diese und einige andere typische Formen der sauren Fäulnis in »natürlicher Reinzucht« zu erhalten. Es ist zu bedauern, daß Henneberg in seiner mühevollen Arbeit über Milchsäurefermente (Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1903. No. 22) sich mit der so aussichtsvollen Frage der Anhäufung nur so wenig beschäftigt hat.

geimpft und bei 30° C kultiviert werden; nach 2 oder höchstens 3 Tagen ist die Agglutination am deutlichsten.

Kocht man Würzekulturen reiner agglutinierender Bakterien, so ergibt sich, daß nachträglich darin ausgesäte Hefe vorzüglich wächst, jedoch nicht agglutiniert.

4. *Kolonieenzüchtung in flüssigen Nährmedien.*

Wenn man in große Glasdosen mit vollständig ebenem Boden[1]), welche auf einer schwarzen, ebenen Tischplatte genau horizontal aufgestellt sind, eine dünne Schicht einer geeigneten Nährflüssigkeit bringt, worin die zu kultivierenden Keime in sehr großer Verdünnung suspendiert sind, so läßt sich leicht einsehen, daß, wenn vollständige Ruhe herrscht, die Keime sich, je nachdem sie zu beweglichen oder unbeweglichen Arten gehören, zu Schwärmen oder Kolonieen ausbilden, welche kürzer oder länger frei nebeneinander liegen und dann leicht in reinem Zustande übergeimpft werden können. Das Verfahren wurde zunächst verwendet für die Reinkultur von Spirillen, wobei man bezüglich des Gelatineverfahrens auf Schwierigkeiten stößt, und ist besonders geeignet für das Auffinden der flockenbildenden Hefen, sowie für die Untersuchung von Hefen im allgemeinen.

Bei den beweglichen Bakterien kann es vorteilhaft sein, der Kulturflüssigkeit zum Zwecke der Verdickung eine geringe Menge, z. B. $^1/_{10}$ Proz., Gelatine oder Irländisches Moos beizugeben, damit keine Konvektionsströme stattfinden können, doch ist das bei richtiger Ausführung des Versuches nicht notwendig, welche Bemerkung natürlich auch für die Hefekultur gilt. An dieser Stelle soll nur über letztere gesprochen werden, und ich nehme als Beispiel die Untersuchung von Preßhefe.

Die dazu verwendete Nährflüssigkeit ist wieder Würze, welche also entweder wohl oder nicht mit einer Spur Gelatine versetzt, und worin das zu untersuchende Material genügend verdünnt suspendiert ist. Die Keime sinken bald zu Boden oder bleiben suspendiert und entwickeln sich zu Kolonieen, welche allerdings auf dem Boden zu kleinen, scharf begrenzten, zirkelrunden Feldern auseinander fallen infolge ihrer Schwere. Auch die Milchsäurefermente, welche immer unbeweglich sind, verhalten sich ähnlich. Nur gewisse Essigbakterien können sich von der Stelle fortbewegen, und sind eben daran kenntlich; aber auch die meisten Essigbakterien sind nicht beweglich, und bekanntlich sind dieselben in Preßhefen ziemlich selten. Die Aërobakterarten (wie *Coli* und *Aërogenes)* sind in Preßhefe zwar immer gegenwärtig, aber so vereinzelt, daß man dieselben bei der hier in Betracht kommenden Verdünnung nicht bemerkt, und nur durch geeignete Anhäufungsverfahren nachweisen kann.

Wenn es sich nun um den Nachweis der agglutinierten Kolonieen handelt, so wird wie folgt verfahren: Zunächst sei bemerkt, daß dieselben, wenn auch nicht ge-

---

[1]) Dieselben werden dem hiesigen Laboratorium geliefert durch Herrn Instrumentenhändler Giltay in Delft. Hat man keine Dosen mit ebenem Boden, so kann man diese dadurch herstellen, daß man auf den unebenen Boden der gewöhnlichen Glasschalen eine dünne Schicht einer konzentrierten Lösung von Agar in Wasser ausgießt, welche man erstarren läßt. Dieselben sind jedoch nicht für alle Zwecke brauchbar, z. B. können sie nicht verwendet werden für Algenkulturen. Dafür muß man den Agar durch Kieselsäure ersetzen.

rade selten, doch durchaus nicht allgemein sind; deshalb muß die Verdünnung nicht zu weit getrieben werden und z. B. ein paar Tausend Kolonieen auf 2 dm² Bodenfläche zur Untersuchung kommen. Diese Untersuchung ist eine sehr einfache und besteht darin, daß man mit der größten Vorsicht die Kulturflüssigkeit von den am Boden liegenden Kolonieen abgießt. Tut man dieses unvorsichtig, so sieht man natürlich gar nichts; geschieht es jedoch ruhig und langsam, so fließen alle gewöhnlichen Formen mit der Flüssigkeit ab, während alles, was agglutiniert ist, entweder an der Stelle bleibt, oder beim Abfließen als zusammenhängende Flocken sofort kennbar ist, mit dem Platinfaden aufgehoben und durch Übertragen in Uhrgläser mit reiner Würze oder mit Wasser von den anhängenden Mikroben befreit werden kann. Die auf dem Glasboden zurückgebliebenen agglutinierenden Kolonieen können ebenfalls durch vorsichtiges Abspülen leicht genügend gereinigt werden, um beim nun folgenden Abstreichen auf Würzegelatine Striche zu erzeugen, entweder der Autoagglutinatoren *S. curvatus, S. muciparus* und der Flockvarietät der Preßhefe selbst, oder der durch *Lactococcus agglutinans,* und viel seltener durch *Lactobacillus densus* und *Lactobacillus conglomeratus* symbiotisch agglutinierenden gewöhnlichen Art.

Weil die Flockenbildung auch in industriellen Betrieben stattfindet, kann man aus gewöhnlicher, im Laden gekaufter Preßhefe auf folgende einfache Weise symbiotisch agglutinierende Kolonieen erhalten: Man schüttelt die Hefe mit Wasser auf, läßt absetzen und gießt das Wasser mit der oberen Hefeschicht ab; der Bodensatz wird aufs Neue aufgeschüttelt und absetzen gelassen, es wird aufs Neue abgegossen und diese Manipulation wird einige Male wiederholt. Schließlich gießt man den Rückstand in eine Glasdose, welche auf einem schwarzen Tische steht. Man bemerkt dann mit einer schwachen Lupe sehr leicht, daß zwischen den losen Hefezellen schleimige Flocken umhertreiben, welche mit dem Faden aufgehoben, abgewaschen und auf Würzeagarplatten abgestrichen werden. So bekommt man leicht Einzelkolonieen von agglutinierenden Lactobacillen und Lactokokken und auch, wenn auch viel seltener, Kolonieen von *S. curvatus* und von autoagglutinierender Preßhefe selbst.

5. *Nachweis von Unterhefe und Oberhefe nebeneinander.*

Es ist klar, daß man durch das im vorigen Abschnitt beschriebene Verfahren Ober- und Unterhefe nebeneinander quantitativ bestimmen kann. Die Agglutination der Unterhefe ist aber eine so vollständige, daß man in diesem Falle auch noch auf folgende Weise auskommen kann: Anstatt flüssiger Nährmedien macht man auf die gewöhnliche Weise eine Streukultur des zu untersuchenden Gemisches auf der Oberfläche einer Würzeagarplatte, wozu die Hefe in Wasser aufgeschüttelt und dann, nach richtiger Verdünnung, auf die Agarplatte gegossen und wieder abgegossen wird, wodurch eine genügende Zellenzahl am Agar festgeklebt zurückbleibt. Durch vorsichtiges Erwärmen läßt man die Platte abtrocknen und kultiviert bei 30° C. Wenn die Kolonieen entwickelt sind, werden sie gezählt. Dann wird vorsichtig mit Wasser übergossen, welches die Oberhefekolonieen auflöst und die agglutinierenden Unterhefekolonieen zurückläßt, wodurch letztere allein bestimmt werden können und wobei man nach einiger Übung sehr gute Resultate erhält.

Da es erwünscht ist, solche Versuche auf anderem Wege kontrollieren zu können, mag hier noch ein anderes Verfahren erwähnt werden, um den gleichen Zweck

zu erreichen, nämlich vermittelst der auxanographischen Methode, welche in diesem Falle wie folgt angewendet wird:

Man suspendiere in Fleischbouillon- oder in Hefewassergelatine, welche, um nicht allzu fest zu werden, nur 7 Proz. Gelatine enthält, das Hefematerial, und zwar in solcher Verdünnung, daß die sich entwickelnden Kolonieen gezählt werden können. Man gieße sie in eine Glasdose und lege nun nach dem Erstarren an der einen Seite der Dose auf die Oberfläche der Gelatine ein wenig Melibiose und, soweit möglich davon entfernt an der anderen Seite etwas Glukose. Der in einem Zirkelfelde sich durch Diffusion verbreitende Zucker erzeugt nun in der bekannten Weise Auxanogramme. Im Melibioseauxanogramm finden sich aber nur Unterhefekolonieen, während im Glukoseauxanogramm Ober- und Unterhefe beide zur Entwicklung kommen, welche nun leicht abgezählt werden können.

Bei einem solchen Versuche verwendet man keine 10-proz. Gelatine, weil die Härte des Bodens das Hefewachstum behindert, besonders von der Oberhefe.

Nach dem Abzählen der Kolonieen überzeuge man sich, ob in den Zwischenräumen zwischen denselben nicht gewachsene Hefezellen vorkommen, was natürlich einige mikroskopische Übung voraussetzt.

In mit Unterhefe versetzter Preßhefe kann man durch die Melibiosemethode auch ziemlich genau die Unterhefe quantitativ bestimmen, weil weder die Preßhefe selbst, noch *S. curvatus, S fragrans, S. muciparus* und *S. mycoderma* mit Melibiose wachsen, sich also in dieser Beziehung wie Oberhefe betragen.

Influence des températures absolues de 82 et 20 degrés centrigrades sur la vitalité des microbes

Recherches faites au Laboratoire microbiologique de Delft et au Laboratoire cryogène de Leyde.

Par M. W. BEIJERINCK de Delft et H. C. JACOBSEN de Delft.

Premier congrès international du froid, Paris, 1908.

Bien que quelques expérimentateurs se soient déjà occupés de rechercher si les microbes peuvent conserver leur vitalité à des températures très basses, de nouvelles études, distinées à résoudre les problèmes fondamentaux que présente cette question insuffisamment approfondie, ne seront certainement pas superflues.

Les mémorables recherches de L. Pasteur ont définitivement résolu la question de la génération spontanée et nous savons que les germes, connus à présent, ne peuvent naître que d'autres germes. Sans doute, la connaissance des microbes, si imparfaite encore, doit nous faire croire à la possibilité et même à la probabilité de l'existence actuelle ou antérieure de formes plus simples, dont la réalité a jusqu'ici échappé à toutes les tentatives scientifiques faites pour la démontrer, et qui, par une longue série, lentement graduée, enchaînerait le monde vivant à la matière organique non vivante. L'état imparfait de nos connaissances nous oblige à examiner toutes les hypothèses capables d'amener la solution du grand problème qui se présente ici. Parmi ces hypothèses, celle de l'origine extra-tellurique de la vie mérite une attention particulière, tant à cause de l'importance pratique qui s'attacherait à sa vérification qu'à cause de son caractère purement philosophique.

Richter[1]) et plus tard Helmholtz (1876) en Allemagne et William Thomson en Angleterre (1871) avaient admis, il y a longtemps déjà, que des germes vivants pouvaient être apportés à la terre par des météorolithes. Cohn a repris la question et a émis l'hypothèse que les poussières atmosphériques pourraient quitter la terre et, après leur parcours à travers l'espace, aborder à d'autres corps célestes, peut-être stériles jusque-là, et les peupler de la même manière que la terre l'aurait été elle-même autrefois.

---

[1]) Dr. Schmidt's Jahrbuecher fuer die ges. Medicin, Bd. 126, p. 248, 1865; Bd. 151 p. 321, 1871.

Récemment, la valeur de cette hypothèse a été renforcée par les expériences de plusieurs savants et plus particulièrement par les recherches approfondies de M. Arrhénius.

M. Arrhénius a démontré que des particules de la grosseur des germes microbiens à l'état sec, peuvent être mises en mouvement dans le vide par les radiations lumineuses et acquérir une vitesse considérable. De plus, il a démontré la vraisemblance de l'existence de forces électriques, qui pourraient entraîner ces particules non seulement hors de notre atmosphère, mais hors de la sphère d'attraction du globe terrestre dans l'espace, où la lumière s'en empare et les fait voyager vers d'autres corps célestes. Ces considérations, qui viennent à l'appui du panspermisme cosmique, nous amènent à rechercher quels sont les organismes, connus à présent, qui pourraient conserver leur vitalité, sous les conditions particulières où ils seraient placés, s'ils quittaient notre terre. Ces conditions sont principalement les suivantes: température basse, peu supérieure au zéro absolu; absence totale d'eau, au moins à l'état liquide; absence totale d'oxygène, rendant impossible la fonction respiratoire aérobie.

En ce qui concerne l'humidité, il semble à présent démontré que même les semences des végétaux supérieurs, tels que le blé, l'orge et le trèfle, conservent leur vitalité dans une atmosphère si sèche, que le spectroscope n'y décèle aucune trace de vapeur d'eau. Certaines spores de bactéries résistent aussi, parfaitement bien, à une dessication absolue opéré à des températures ordinaires. On peut donc admettre que ce ne serait pas la dessiccation qui pourrait détruire les germes après qu'ils auraient quitté notre planète.

L'influence des basses températures, considérée en soi, est, d'après nos expériences, plutôt favorable que nuisible à la conservation de la vitalité, comme le prouve le fait suivant: Les bactéries lumineuses à une température ordinaire sont très sensibles à la dessiccation; une culture, absorbée par du papier buvard, perd rapidement au dessèchement sa luminosité et les bactéries ne sont plus cultivables. Tout au contraire, à la température de l'air et de l'hydrogène liquides, qui, par la réfrigération de l'eau, sont, elles aussi, accompagnées d'une dessiccation complète, la vitalité n'est aucunement altérée pour le *Photobacter phosphorescens* et n'est que légèrement et passagèrement influencée pour le *Ph. indicum.* Il est donc évident que les basses températures protègent les bactéries contre les influences nocives qui accompagnent la dessication à la température ordinaire. On ignore la nature précise de cette influence, mais dans toute culture de microbes il existe des produits d'excrétion, dont la toxicité pour ces organismes est bien connue et qui se manifeste en certains cas par la liquéfaction du protoplasme des microbes. Bien avant la visibilité du phénomène limite, l'action d'une influence pernicieuse ne semble pas exclue. Il en est de même pour les températures supérieures qui activent les réactions chimiques de toute nature et, sans doute aussi, la toxicité microbienne qui, au fond, doit être quelque réaction chimique entre les molécules de forme complexe.

Les levures aussi, quoique très sensibles à la dessiccation à température ordinaire, résistent assez bien aux basses températures et leurs spores semblent même rester absolument indemnes au dessèchement dans l'air liquide.

Quant à la possibilité de l'existence d'une vie latente totalement anaérobie

et pour un temps presque illimité, rien ne semble s'y opposer; au contraire, la présence d'oxygène semble parfaitement superflue dans de telles conditions, toutes traces de respiration et de phénomènes biologiques en général étant absolument exclues.

On verra d'autre part, par les recherches qui seront exposées dans les pages suivantes, de nouvelles preuves de l'indifférence absolue de beaucoup de germes à l'égard des très basses températures, où toute activité vitale semble supprimée. Les résultats de ces recherches donnent un caractère scientifique incontestable à la théorie du panspermisme cosmique et permettent d'entrevoir les conséquences importantes qui résulteraient du développement sur notre planète de germes provenant du dehors. Mais en outre de cette théorie d'ordre spéculatif, notre sujet présente encore une grande importance à un point de vue purement pratique; il nous a donc semblé, à ce double point de vue, d'un intérêt réel d'utiliser les facilités qui nous ont été offertes par M. Kamerlingh Onnes dans le laboratoire cryogène de Leyde pour compléter nos études sur ce sujet. Toutes les expériences suivantes mettant en œuvre les basses températures ont eu lieu à Leyde, tandis que les cultures de bactéries s'effectuaient au Laboratoire microbiologique de l'Université Technique de Delft.

Quelques expériences préliminaires faites avec l'air liquide (—191 degrés centrigrades) commencées le 22 novembre 1907, nous permirent d'acquérir une certaine habileté expérimentale. Les premières recherches portèrent sur des bactéries ordinaires qui se trouvent dans le lait ordinaire, le ferment lactique du lait acidifié spontanément à température moyenne *(Lactococlus)* sur des *Photobacterium phosphorescens* de poissons lumineux ne liquéfiant pas la gélatine, sur la *Chlorella vulgaris* appartenant aux Chlorophycées, sur un *Nostoc* et sur un *Anabæna*, tous deux des Cyanophycées, les deux dernières en culture impure, contenant, en outre, des Chlorophycées et des Bactéries. La réfrigération ne dura que peu de temps, il s'écoula quinze minutes entre l'instant où la congélation dans l'air liquide fut complète jusqu'au moment où la culture en fut retirée.

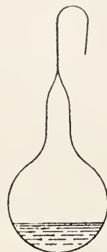
Tout d'abord on constata que les éprouvettes de gélatine trop remplies et dont le contenu était verticalement ou obliquement solidifié ne pouvaient être employées, car elles éclataient toutes par la dilatation de la masse interne qui se congelait en dernier lieu. C'est pourquoi, dans tous les cas où il s'agissait de cultures sur gèlatine, on se servit dès lors d'éprouvettes contenant seulement une couche très mince de gélatine. La congélation dans des tubes incomplètement remplis de liquide ou de gélatine, tels que le fond restait en partie découvert, n'offrait pas non plus de difficultés. Il fallait seulement prendre soin d'opérer la liquéfaction très lentement ou très rapidement, suivant le cas, afin que la masse déjà fondue ne pût se congeler de nouveau, ce qui, par la dilatation qui en aurait été la conséquence, eût infailliblement fait brîser l'éprouvette. Pour hâter la liquéfaction dans la partie supérieure de la masse congelée, on versait sur les tubes de l'alcool ou du pétrole, c'est-à-dire des liquides à chaleur spécifique bien supérieure à celle de l'air. Les éprouvettes contenant les 10 centimètres cubes de la culture destinée à l'expérience et appartenant au groupe des microbes aérobies, étaient suspendües à l'intérieur de chambres de Dewar, remplies d'air liquide.

Les résultats de ces expériences préliminaires furent les suivants:

Lait ordinaire du marché 15 minutes à —191 degrés centigrades, au début et à la fin de la réfrigération ensemencée sur du petit lait gélatiné: ni le nombre des colonies ni celui des espèces n'avaient subi de changements appréciables.

Acidification dans le lait brut. Deux portions de 50 centimètres cubes de lait stérilisé avaient été mêlées, l'une avec 1 centimètre cube de lait ordinaire du marché, frais, et l'autre avec 1 centimètre cube de ce même lait après réfrigération (15 minutes à —193 degrés centigrades), et puis cultivées pendant cinq jours à 30 degrés centigrades. Le titre en acide, déterminé avec de l'alcali normal, était alors: pour la première portion 10^{cm^3}, 4; pour l'autre, 10^{cm^3}, 1; il s'était donc produit une légère diminution par suite du froid.

Acidification par le Lactococcus, réfrigérée ou non réfrigérée. Elle ne montrait pas non plus de modifications considérables. Il était cependant à remarquer, que le lait stérilisé mis en présence de ce lait brut réfrigéré ne donnait que de rares colonies d'*Oïdium lactis* et de *levure de lactose*, tandis que, avec le même lait non traité, il s'en produisait un grand nombre. Il est donc évident que ces derniers microbes ne supportent la réfrigération que difficilement.



Ballon d'essai contenant la culture réfrigérée.

Photobacter phosphorescens. Cultivé sur de la gélatine de poisson, ce microbe fut mis en suspension dans de l'eau de mer et examiné par la méthode de culture sur le substratum indiqué avant et après la réfrigération (15 minutes à — 193 degrés centigrades): on ne constata pas de différences.

Chlorella vulgaris, peut-être la forme la plus primitive de toutes les Chlorophycées, cultivée en des conditions très diverses, après une réfrigération de 15 minutes à—193 degrés centigrades, ne présenta aucun changement appréciable.

Mais il en fut différemment pour l'*Anabæna* et pour le *Nostoc*, deux genres de Cyanophycées qui, dans les mêmes conditions, se comportèrent de façon toute autre: la plupart des germes, dans cette expérience, périrent. De plus, les cultures réfrigérées, cultivées à la lumière dans de l'eau de conduite à 0,05 pro cent d'azotate d'ammoniaque et 0,05 pro cent de biphosphate de potasse, tardent très longtemps à se développer en comparaison avec les cultures ordinaires.

Ainsi donc, les résultats de ces premières expériences montrent que ni la *Chlorella*, ni les bactéries n'étaient altérées par une réfrigération de 15 minutes à — 191 degrés centigrades, tandis que les *Nostoc*, les *Anabæna*, l'*Oïdium lactis* et la *levure de lactose* étaient partiellement détruites.

Le 29 novembre 1907, une nouvelle série de recherches fut entreprise où l'influence de l'air liquide fut plus longtemps appliquée, et où l'on se servit en outre d'hydrogène liquide.

Afin que l'hydrogène, qui s'évaporait sous l'action d'une pompe d'aspiration, fût aussi peu que possible dépurifié d'air, les microbes étaient enfermés dans des ballons d'essai terminés par un chrochet pour y fixer un fil de cuivre (Voir la figure ci-contre). Les résultats de ces recherches sont donnés par le tableau suivant:

Expériences faites avec de l'air liquide, 10 heures à — 193 degrés centigrades.	Expériences faites avec de l'hydrogène liquide, 45 minutes à — 253 degrés centigrades.

Lait ordinaire du marché examiné sur de la gélatine au petit lait avant et après la réfrigération.

Nombre de colonies par centimètre cube *non altéré.*	Nombre de colonies *non alteré.*

Lait acidifié.

Recherche du nombre de *Lactococcus* sur de la gélatine au petit lait.

Nombre de colonies par centimètre cube *non altéré.*	Nombre de colonies *non altéré.*

Photobacter phosphorescens et *Ph. indicum.*

Examinés sur de la gélatine ou de l'agar au bouillon de poisson et dans du bouillon liquide.

Pendant le transport à Delft l'intensité de la phosphorescence des tubes fut diminuée, mais elle se rétablit plus tard. Le nombre de colonies n'etait *pas changé.*	*Idem.*

Expériences faites avec de l'air liquide, 10 heures à —192 degrés centigrades.	Expériences faites avec de l'hydrogène liquide, 45 minutes à — 253 degrés centigrades.

Chlorella vulgaris, examinée sur de la gélatine au moût.

Beaucoup de cellules sont mortes ; on les retrouve facilement parmi les colonies.	Ici de même on trouve un certain nombre de cellules mortes.

Levure pressée, examinée sur du moût gélatinisé.

La levure était détruite pour environ 95 pro cent; les cellules mortes se colorent en bleu par le bleu de méthylène.	Détruite pour une grande partie mais il en survivait 10 pro cent, donc plus que dans l'air liquide.

Spores de Mucor racemosus. Réfrigération des spores en suspension dans de l'eau et examinées par cultures en colonies sur du moût gélatinisé.

Le nombre des colonies reste identique avant et après le refroidissement.	*Idem.*

Spores d'Aspergillus niger.

Comme dans le cas précédent.	*Idem.*

Anabæna et Nostoc. Les cultures placées dans une solution nutritive.

Toutes les cellules détruites.	*Idem.*

Les résultats de cette deuxième série d'expériences ont donc été analogues à ceux de la première. Les bactéries communes du lait, *Lactococcus* et les bactéries lumineuses résistent à la réfrigération, de même que les spores de moisissures *Aspergillus niger* et *Mucor racemosus*. Les cellules de *Chlorella* sont détruites en partie par la réfrigération prolongée; il meurt également un pourcentage considérable (95 pro cent) des cellules de la levure pressée; les *Nostoc* et les *Anabæna* sont tous tués.

Comme l'emploi de l'hydrogéne liquide comparé à celui de l'air liquide ne causait pas de différences appréciables, tandis qu'il offrait plus de difficultés pratiques, on ne se servit dans la suite que d'air liquide.

Une troisième série d'expériences uniquement opérées avec l'air liquide pendant trois et onze jours commença le 13 décembre 1907.

Les germes du lait ordinaire de macché, les *Lactococcus*, et les *Photobacter phosphorescens* ne montrèrent aucune altération, même après onze jours de réfrigération.

Avec les *Photobacter indicum* le phénomène, signalé déjà, se manifesta de nouveau après trois jours de refroidissement, c'est-à-dire que les cultures réfrigérées, arrivant à Delft, avaient en partie perdu leur luminosité.

Les cellules de *Chlorella vulgaris*, soumises pendant onze jours à la refrigération de l'air liquide, étaient détruites dans la proportion de 50 °/o environ, ce qu'on put constater par l'application du bleu méthylène et par l'ensemencement sur du moût gélatinisé. Les *Cyanophycées*, c'est-à-dire les *Nostoc* et les *Anabaena* du sol, qui s'accumulent dans les cultures fixant l'azote libre, c'est-à-dire dans de l'eau de conduite, contenant 0,05 pro cent de phosphate de potasse ensemencé avec du terreau de jardin et exposé à la lumière, furent détruites par le refroidissement. Pour la *levure pressée en culture pure* sur du moût gélatinisé, au bout de trois jours, la plus grande partie des cellules avaient péri, comme le montrent l'emploi du bleu méthylène et la culture sur de la gélatine au moût: seulement 1 pro cent des cellules restaient incolores. La fermentation dans le moût se produisait avec à peu près la même intensité que sans refroidissement.

La levure de vin (vin de Bordeaux) était également sensible à la réfrigération, le tiers des cellules ayant péri. Mais comme la culture primitive contenait des spores, on pouvait se demander si peut-être les spores seules avaient résisté. Le calcul prouvant qu'il n'y avait que 5 à 10 pro cent de cellules sporogènes, un grand nombre de cellules végétatives avait en effet survécu.

Les cultures de *Schizosaccharomyces octosporus* contiennent normalement des asquès à huit spores, et des cellules végétatives qui ont perdu le pouvoir sporogène. Après la réfrigération de onze jours, toutes les cellules végétatives se colorèrent en bleu par le bleu méthylène, mais non par les spores. Ensemencées sur de l'agar au moût, il ne se développait que des colonies contenant de asques, ce qui prouve que toutes les cellules végétatives avaient péri.

Nous voyons donc que, en ce qui concerne les bactéries, cette derniére série d'expériences conduisait au même résultat que la précédente; il en était de même pour les *Cyanophycées* et les *Chlorella*. Les *Chlorella* sont, comme on le voit, beaucoup plus résistants que les *Anabæna* et les *Nostoc*, ce qui est assez inattendu.

Les résultats pour les levures furent les plus intéressants. La levure pressée et le *Schizosaccharomyces octosporus* se montrent très sensibles, la levure de vin un peu moins; le *Saccharomyces mycoderma* résiste parfaitement à la réfrigération. C'est pourquoi, dans les recherches qui suivirent et qui furent commencées le 22 juin 1907, on se préoccupa tout particulièrement des levures.

Dans cette nouvelle série d'expériences, une culture de levure pressée sur de la gélatine au moût fut réfrigérée pendant quinze jours: 1 pro cent seulement des cellules fut conservé.

Cette épreuve fut répétée avec une culture pure développée de cellules qui avaient survécu à une réfrigération de trois jours. On comptait les cellules vivantes de la levure, après l'avoir suffisamment diluée d'eau, directement au microscope, d'après la méthode du bleu méthylène. On trouva que 61 pro cent des cellules avaient péri. Puis, avec la méthode des colonies sur la gélatine au moût, on constata que 62 pro cent des cellules étaient détruites. Un échantillon de levure commerciale, contenant outre *Saccharomyces panis* lui-même, des *Saccharomyces mycoderma*, une levure sauvage, le *S. pseudo-fragrans* et des bactéries, fut réfrigéré pendant 0, 3, 6, 9, 12 et 15 jours et examiné comme dans le cas précédent. En admettant, que le nombre de bactéries n'avait pas changé, on put calculer, d'après le nombre total des colonies qui s'étaient développées, le pourcentage des levures restées en vie.

Nombre de colonies présentes sur les plaques.

Après un séjour dans l'air liquide	Ensemble.	*Saccharomyces panis.*	*Saccharomyces mycoderma*	*Saccharomyces pseudo-fragrans.*	Bactéries.
—	—	—	—	—	—
0 jour	191	155	5	25	6
3 jours	105	35	19	25	50
6 —	242	22	14	25	206
9 —	116	15	0	25	93
12 —	119	20	16	25	83
15 —	200	26	6	25	168

Le nombre des bactéries étant constant, on voit que le *Saccharomyces panis* périt entre le deuxième et le troisième jour jusqu'à un minimum qui reste dès lors le même; pour le *S. mycoderma* le résultat est incertain; le *S. pseudo-fragrans* a complètement disparu dès le troisième jour.

Des expériences spéciales faites avec le *Saccharomyces mycoderma*, le *S. apicalatus* et l'*Oïdium lactis* prouvèrent qu'une réfrigération de quinze jours était sans effet sur leur vitalité, tandis que dans une levure de lactose, une proportion de 75 pro cent disparut dans les mêmes conditions. Le fait depuis longtemps connu, que l'ensemencement des spores de levure produit des colonies beaucoup plus riches en spores que celles venant de cellules végétatives, donna lieu à quelques expériences complémentaires faites avec de la levure de vin de Bordeaux et des *Schizosaccharomyces octosporus*. On y ajouta encore deux levures très riches en spores et souvent cultivées dans notre laboratoire, le *Saccharomyces zygosaccharomyces* et le *S. uvarum* (espèce voisine de *S. pastorianus*). Toutes ces levures se trouvaient sur de la gélatine au moût, mais la culture de la dernière espèce était si récente que les spores ne s'étaient pas encore développées. Pourtant 55

a 75 pro cent des cellules supportèrent sans inconvénient un refroidissement de quinze jours dans l'air liquide. Mais il y a d'autres cas encore où les jeunes cellules, pleines de protoplasme, montrent une grande résistance aux influences nocives; c'est un caractère généralement répandu dans le règne végétal. Les cellules de levures sporogènes se laissent même reconnaître aisément au microscope, grâce à leur richesse en matière vivante, parmi celles destinées à rester stériles dont les vacuoles sont beaucoup plus grandes.

Le *Saccharomyces zygosaccharomyces*, isolé de raisins de Corinthe, était une culture assez vieille et contenant très peu de spores. Après une réfrigération de vingt-cinq jours, il ne produisit que de colonies pleines de spores, ce qui prouve que les spores seules avaient survécu. C'est donc une excellente méthode pour régénérer cette espèce quand le pouvoir sporogène s'en est affaibli.

Le *Schizosaccharomyces pombe* donne un résultat absolument analogue.

Le *Schizosaccharomyces octosporus*, si remarquable par sa facilité à produire différentes variétés tout à fait stables et qui se distinguent par leur pouvoir sporogène très inégal, fut soumis à l'influence de l'air liquide pendant quinze jours tant sporogène que non sporogène. Les spores résistèrent parfaitement tandis que les cellules végétatives disparurent à l'exception de quelques rares cellules qui se reproduisirent sur de la gélatine au moût. Peut-être serait-il possible d'obtenir de cette manière une forme plus stable à l'égard de basses températures, telle que nous en avons décrit une dans les expériences avec la levure pressée des boulangers.

Enfin, deux espèces de *Nostoc*, l'une de couleur rouge sombre, l'autre d'un bleu gris, furent soumises à un refroidissement prolongé. Ainsi que le cas s'était présenté pour les autres Cyanophycées précédemment étudiées, ces *Nostoc* périrent, comme on put s'en rendre compte par la sortie du phycocyan des cellules et la magnifique couleur qu'il donna à l'eau ambiante. C'est là peut-être la meilleure manière de préparer ce pigment intéressant mais peu stable. La fluorescence en rouge-orange de cette solution est très remarquable; son spectre coïncide avec les deux bandes les plus marquées du spectre d'absorption de la chlorophylle, c'est-à-dire avec la bande entre B et C dans le rouge et avec la bande placée dans l'orange.

De tout ce qui précède, on peut tirer la conclusion suivante:

Tous les microbes sporogènes, même les moisissures et les levures, resistent aux basses températures, tandis que plusieurs de ces mêmes organismes à l'état de cellules végétatives y sont beaucoup plus sensibles, bien qu'il se trouve souvent parmi les cellules mortes quelques raras cellules végétatives qui, elles aussi conservent leur vitalité. Si l'on ensemence de nouveau ces cellules végétatives survivantes, tout au moins en se servant de la levure pressée des boulangers, on obtient une espèce bien plus résistante que l'espèce primitive.

En contradiction avec ce qu'on pouvait attendre, d'après les opinions généralement acceptées, sur la simplicité des Cyanophycées, des expériences ont montré que ces organismes, et plus particulièrement les *Nostoc* et les *Anabæna* sont assez sensibles au froid. Leur mort par le froid cause la diffusion hors de la cellule des pigments solubles dans l'eau, tels que le phycocyan, qui donne avec la chlorphylle, la couleur particulière à ces microbes. Ce serait là peut-être la meilleure mé-

thode à employer pour se procurer des quantités considérables de ces pigments si instables.

Le genre *Chlorella*, le plus simple des Chlorophycées, résiste beaucoup mieux à la réfrigération.

Quant aux bactéries non sporogènes, nous avons vu que les espèces vulgaires, trouvées dans le lait ordinaire du marché, conservent leur vitalité sous n'importe quel refroidissement. Au point de vue pratique on ne peut donc rien espérer du froid dès qu'il s'agit d'une stérilisation absolue. Mais l'influence nocive, bien que passagère, de la température de l'air liquide sur la luminosité de *Photobacter indicum* nous semble assez importante parce qu'il faut en conclure que la réfrigération prolongée ne pourra pas être supportée par cette espèce.

En ce qui concerne la question de la panspermie cosmique, la conclusion de ces séries d'expériences est que ce ne sont certainement pas les Cyanophycées qui peuvent être mises en mouvement à travers l'espace par l'influence de la lumière sans perdre leur vitalité, mais qu'on peut admettre, quoiqu'un peu douteuse, la possibilité de ce transport à l'état vivant pour les cellules jeunes de *Chlorella*, forme la plus simple parmi les Chlorophycées, de plus, sans doute, pour les spores de certaines moisissures et levures et de plusieurs bactéries, enfin pour plusieurs bactéries non sporogènes aussi, mais pas pour toutes les espèces connues.

Variability in Bacillus prodigiosus.

Proceedings of the Section of Sciences, Kon. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, Vol. XII, 1910, p. 640—649. — Verscheen onder den titel »Variabiliteit bij Bacillus prodigiosus« in Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen, Wis-en Natuurk. Afd., Deel XVIII, 1910, blz. 596—605.

In a former paper[1]) I showed how easily new constant variants of *Bacillus prodigiosus* and other microbes may be obtained. Here follow some further observations, made with the aid of Mr. H. C. Jacobsen, assistant in my Laboratory.

The keeping constant of the cultures.

The principle on which the keeping constant of *B. prodigiosus* seems to repose is preventing the cultures from becoming alkaline by their own action. Thus, by re-inoculating in quick succession, for instance every 24 hours, into bouillon or on bouillon-agar at 30° C., each form of *Bacillus prodigiosus*, whether the natural or normal form, or a variant obtained from it, remains unchanged probably for an indefinite time.

For the transplantations only very little material must be used and abundance of food.

If some lactic acid is added, for instance 0,5 to 1.5 cm^3 normal per 100 cm^3 of bouillon, the culture likewise remains unchanged after a prolonged series of transports, if these are always carried out before the acid is neutralised by the alkali produced from the bouillon by the bacteria themselves[2]).

Addition of 1 to 2 pCt. of glucose acts in the same manner as free acid, *B. prodigiosus* therefrom producing acid which may rise, if sufficient glucose is added, to 3 to 4 cm^3 normal per 100 cm^3 of bouillon. As the titre of alkali, originating in the bouillon alone, can amount to 2.5 cm^3 N per 100 cm^3 of bouillon, and as from 1 pCt. of glucose there results no more than 1.5 to 2 cm^3 N of acid, addition of 1 pCt. of glucose is sufficient to prevent variation, if the re-inoculations take place quickly; but not if effected with long intervals, for in the latter case more alkali may result from the bouillon than acid from the glucose.

If to the bouillon so much ammoniumcarbonate or natriumcarbonate is added that the titre of alkali amounts to about 3 cm^3 N per 100 cm^3 of the medium,

---

[1]) Royal Acad. of Sciences, 21 Nov. 1900.

[2]) At 4 cm^3 of acid per 100 cm^3 of culture liquid the growth of *B. prodigiosus* is slackened, at 9 cm^3 it is quite stopped.

B. prodigiosus likewise remains constant after repeated inoculations at 30° C., whilst the control culture, without carbonate but for the rest under the same conditions, strongly varies. The same result may be obtained with magnesiumhydrophosphate ($Mg H PO_4 . 2 H_2O$) to excess; this, however, quickly precipitates, and in order to be active should be used in a bouillon-agarplate or in a thin layer of liquid. In ordinary bouillon-agarplates 1 pCt. of this salt changes entirely into crystals of ammoniummagnesiumphosphate ($Mg NH_4 PO_4 . 6 H_2O$) the plate becoming quite transparent; a plate with 3 to 4 pCt. on the other hand, remains white and turbid.

Although it may be admitted that by these various means the formation of secretion products by the bacteria is prevented, on whose stimulating action the variability probably reposes, yet it, is not clear how this preventing takes place. Evidently substances should be thought of here which, once produced, cannot or only with difficulty leave the bacterial body.

Of the said means quick transplantation is the simplest for always disposing of constant stocks for the experiments.

The origin of the variants in general.

When cultures, placed under favourable nutritive conditions, but for the rest prepared without special precautions, are growing older between 10° and 30° C., they exhibit a certain variability at which, as formerly described (l. c.), variants are thrown off, while beside these the original form is found unchanged. As by transplantations in rapid succession (and under constant and favourable conditions) no change occurs during thousands of cell-partitions, this variability cannot repose on some law governed by internal causes only, but a particular agency is wanted, which may have its seat within the cells, but which must yet be enacted on by external circumstances.

Although the variability can reveal itself already in an ordinary same well arranged culture, e.g. in bouillon or in maltwort, allowed to stand for a few weeks, yet this process may considerably be accelerated by repeated transplantations, *not* after a very short time, but with longer intervals, for example two days, with cultures kept at 30° C., a not too small quantity of the material for the inoculation being used, e. g. two loops of the platinum thread. After three or four repetitions, so after about a week, the variation can then be in full course, the first culture, left to itself, not yet showing any perceptible change.

This evidently reposes on the following circumstance. The influence which causes the variability in the culture when it gets older, acts in the chosen conditions already after two days. If now a re-inoculation is performed, the germs affected by that influence can increase as well as those that remained normal, whilst by not re-inoculating, thus in the first culture, the non-affected germs are by far more numerous and remain so as the cell-division slackens after the second day, because of want of food. At inoculation after two days there result at each time new modified germs, and those which are modified already, are enabled to augment without losing their modification.

In this explanation it must further be accepted, that a transplantation after

two days gives no cause for atavism; for if this were the case, the reverse ought to take place of what is observed: after a week's growth the first culture should be more varied than that which has repeatedly been transplanted, but this is not so. This shows how carefully the variation experiments must be carried out in order not to become obscure.

Particularly the cultures on solid media must very accurately be observed. If these are allowed to stand for some days or weeks without further precautions, then in many cases, even with magnifying glass or microscope no variation at all can be detected, although it is actually going on, commonly to »rose« or »white«.

Colony culture then shows that here and there varied germs or groups of such germs must be present, for from the seemingly homogeneous matter large numbers of white and rose variants are obtained, which prove as constant as the normal form itself. However unchanged colonies, representing the pure stock and producing a material as fit for further experiments as the original culture, lie among the variants.

Experiences afforded by other bacteria seem to prove that the frequent repetition of the thus possible process of selection, produces a form which varies less than the original material. But it is not here the place to enter upon this important fact.

All colony cultures of *B. prodigiosus* are best made on bouillon-agar-plates, which after solidifying have been cautiously dried on a thermostat at circa 40° C. The water which then condenses on the glass cover can easily be removed; if this is neglected, *B prodigiosus*, which is strongly motile, spreads over the surface of the agar and the colonies coalesce.

I shall now enter into a short discussion of the most important variants.

The obtained variants.

The variants derived from *B. prodigiosus* may be considered as plus- or gain-variants, minus- or loss-variants, and qualitative variants. This is exposed below in the table of descent, which shows the origin of the obtained forms; the qualitative variants (*auratus* and *hyalinus*) are placed on the same line with the normal form, the plus-variants above it, the minus-variants beneath. Hence, the arrows not only denote the descent but also whether the variability reposes on gain or loss of characters, or if it is qualitative. Dotted arrows indicate that atavism has with certainty been observed. The names indicate the chief qualities characterising the variants.

A survey of the variants without regard to their descent precedes; then follows their pedigree which does not repose on hypothesis, but simply gives the result of the experiments.

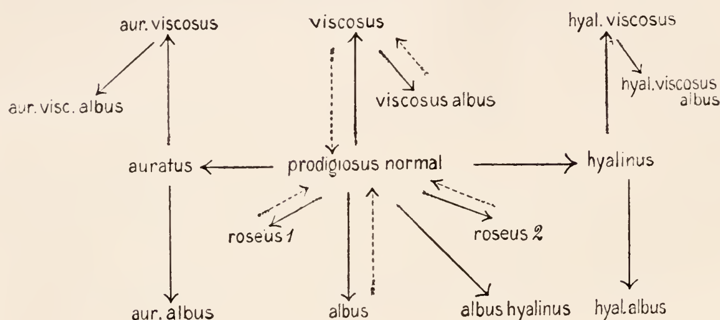
The obtained variants are:

1. *Bacillus prodigiosus.* Normal form, isolated from nature [1]).
2. „ „ *roseus* 1.
3. „ „ „ 2.

[1]) About 1890 from mouldering bones of a gelatinfactory near Delft.

4. *Bacillus prodigiosus. albus.*
5. „ „ „ *hyalinus.*
6. „ „ *viscosus.*
7. „ „ „ *albus.*
8. „ „ *auratus.*
9. „ „ „ *viscosus.*
10. „ „ „ „ *albus* (= 7?)
11. „ „ „ *albus* (= 4?).
12. „ „ *hyalinus*
13. „ „ „ *viscosus.*
14. „ „ „ „ *albus.*
15. „ „ „ *albus* (= 5?

The relation and origin of these variants is given in the following table



The upward arrows denote »gain-variation«, the horizontal »qualitative variation«, the downward arrows »loss-variation«. Dotted arrows signify that atavism has been observed.

The two qualitative colour-variants, *auratus* which is orange-coloured and *hyalinus* of a deep vine-red, vary in a way quite corresponding to the normal form and like this throw off, under the same circumstances, slime-variants and white variants. Besides, the normal form may return by atavism as well from *auratus* and *hyaltinus* themselves as from the variants derived from them. In the pedigree table atavism is indicated by dotted arrows for a few of the cases where it has been staded whit certainty. But there is no doubt that also the other variants are disposed to atavism.

It should moreover be noted that the *auratus*-variant approaches, at least in colour, the natural variety *Bacillus Kieliensis,* but that the latter possesses a stronger power of fermentation, and produces much gas ($CO_2 + H_2$) from maltwort with dextrose or cane-sugar, the former fermenting only dextrose.

For the rest, *B. Kieliensis* itself, which varies in a way quite analogous to that of the normal form of *prodigiosus* here considered, has not yet been obtained as a variant from the latter.

A new character which may rise in addition to the already existing ones, is the production of a large quantity of slime substance by excessive growth of

the cell-wall, which slime may spread through the liquids, and makes the individuals of the colonies on agarplates cohere into one tough mass. From *B. Kieliensis* was even a variant obtained whose colonies appear on the agar plates as a very consistent, almost dry zoogloea, but the analogous variant did not till now arise from the common *prodigiosus*. The *viscosus* (6), derived from the latter, is an ordinary red slime bacterium.

This red-coloured, tough-slimy form, which may be called *B. prodigiosus viscosus*, is no doubt a plus-variant. Its production has been observed under the most different nutritive conditions, between the temperatures 10^0 (in a cellar) and 30^0 C., but always and exclusively in liquid media, never on a solid one. The latter circumstance is apparently the reason why the numerous experimenters, who have studied *B. prodigiosus*, have not seen this variant. It is true that Scheuerlen[1]) observed that old *prodigiosus*-cultures sometimes turn slimy, but he ascribed it to their becoming alkaline and overlooked that a new constant form was produced.

The only distinct condition which seems different in the liquid cultures compared with the solid, is the access of oxygen. In the depht of the liquid this access must, of course, be very deficient for a long time, or even be entirely lacking, as the upper layers of the culture, which are rich in bacteria, take up all the oxygen. Consequently anaërobiose becomes possible in the depht, which is not the case in cultures lying free on a solid medium, and this partial anaërobiose is apparently the stimulus which induces the formation of the slime variant. That here a rather complex influence and not a direct action must be ascribed to the partial withdrawing of the oxygen, follows from the fact that the culture of *B. prodigiosus* at complete exclusion of air, as in a closed bottle, does not, even with repeated transports, give rise to the slimy variant. At temperatures of about 35^0 C. this variant is no more formed, although the growth of *prodigiosus* is then still very strong; at 37^0 the growth slackens or ceases entirely, according to the food.

In the following liquid media the production of the slime variant has with certainty been observed, as well after repeated re-inoculations as after prolonged keeping of one and the same culture at 25^0 to 30^0 C.: in broth, in broth with 1 pCt. of glucose, in malt-wort, in tap-water with 5 pCt. of pure gelatin and 0,02 pCt. K_2HPO_4, and in tap-water with 2 pCt. of glucose, 0.5 pCt. of asparagine, 0,02 pCt. K_2HPO_4, always cultivated at 30^0 C. and with repeated transports after two days or longer. From this we also recognise that there is no question of a direct influence of the food on the production of the variant.

The *auratus*- and *hyalinus*-variants, also, have only taken rise in liquid cultures, namely in broth and in the glucose-asparagine solution. Moreover, *hyalinus*, which is of a deep vine red, is easily obtained from a solution of pure gelatin in tapwater with 0.02 pCt. K_2HPO_4, after repeated re-inoculations, at 30^0 C., whereby also *hyalinus viscosus* results.

The colourless or white variants, which only differ from the original form in producing no pigment, should certainly be considered as minus-variants. They

[1]) Archiv für Hygiene. Bd. 26 p. 1.

are obtained with more ease than the slime variants and, at least as to N⁰ 4, have also been detected by other authors [1]).

Except under the said conditions, apt to keep them constant, all the cultures as well in liquid as on solid media, vary sooner or later towards white. The original form does remain preserved, but a colourles variant is thrown off, which is still more constant than the stock itself.

Not always does one and the same variant result in this case: two uncoloured constant forms, N⁰ 4 and 5 can easily be distinguished if they originate at the same time, and their colonies are on the same agarplate so that they may be compared somewhat magnified. One, *albus hyalinus*, then looks more blueish transparent, the other, *albus*, is more of a cloudy and opake white; under the microscope the former proves to consist of smaller cells than the latter.

The cause of the production of white variants cannot be a more or less abundant access of oxygen, but must probably be sought in a stimulus, exerted by secretion products which remain enclosed in the interior of the cells.

Although the presence of ammoniumcarbonate in the medium (broth-agar), as also cultivation at temperatures higher than 30^0 C. e. g. at 33^0 C., prevent pigment production, no hereditary variation at all is caused by these influences. If the thus treated colourless cultures are transported at 20^0 to 25^0, no white variants are obtained from them, but the normal form is found back unchanged, if at least the above mentioned precautions to preserve the constancy of the stock are not neglected.

When the white variants of the normal form are cultivated at 30^0 C. in bouillon or in malt-wort, the cultures will, after a few re-inoculations, turn slimy like those of the red normal form itself. Colony culture on bouillonagar proves that white slime variants are thrown off, in the same way as the normal form throws off the red ones. The white slime variants (N⁰. 7 ? and 14) correspond by the nature of their colonies to the two white forms, *albus* (4) and *albus hyalinus* (5), considered above.

There is still another method to obtain the colourless slime variant from the red one. If this latter is cultivated at 30^0 in malt-wort or in bouillon, we find after one or two transferrings, each time after two days, and when sown on bouillon-agar, many white slime colonies together with the unchanged red, moreover a considerable number of quite normal, not slimy red colonies, N⁰. 1, which is to be considered as atavism, but an atavism reposing on the loss of a character. The white slime variant, thus obtained by minus-variation, and found in the table as N⁰. 7, seems identic with the one produced by plus-variation from the not slimy white variant, which latter for that reason has not been specially mentioned.

Already in my earlier paper I spoke of rose variants, which so to say, keep the middle between the normal form and the white variant. They may be produced in various ways, for instance, by cultivating the normal form on plates of pure gelatin dissolved in distilled water (H_2O, $10^0/_0$ of gelatin) at room tem-

---

[1]) In Lehmann and Neumann's Atlas 4th Ed. 1907, Table 30, Fig 3, shows a coloured image of a »pure culture« of *prodigiosus*, consisting of red and white colonies.

perature, at which rapid growth and vigorous melting occur. By daily streaking off on a bouillon agarplate the same colony obtained on such pure gelatin, and provided the temperature be kept between 14° and 17° C., we find, on the fifth or sixth day, the first rose variants, either or not with the white, which under these conditions appear later. Two rose variants (table N°. 2 and 3) are easily distinguished, but it is possible that there are many more whose perception is beyond the reach of our observation. In any case, it is a fact that the character: »the faculty of producing pigment«, is divisible in many ways. The hereditary constancy of at least one of these rose variants proved not to differ from that of the normal form.

Another method to obtain rose variants is cultivation of the normal form in bouillon, which by evaporation has been reduced to a threefold concentration. After a single transport already, a large number of rose variants (3) had appeared by the side of normal forms; by a much lighter colour they showed a disposition to lose their colour entirely. The variability of the different rose variants is not the same; the form, obtained by the concentration experiment (3) produces, more readily than the rose variant (2), as well red normal forms (1) as white ones (4). For the rest, this more variable variant has also proved to remain constant when quickly transplanted.

Cases of atavism are frequently observed in these experiments. Thus, for example, the production of the normal form from *viscosus* (6) may easily be seen if the latter grows for a fortnight without transport on a bouillon-agarplate; along the margin of the streaks some few normal colonies (1) will then become perceptible.

The *albus*-variants, also have a disposition to throw off a few red normal forms, but they do so only after growing for weeks or months on bouillon-agar; at first they are very constant.

The to a certain extent completely regular production of the same variants of *Bacillus prodigiosus*, suggests the existence of variability in a special and determined direction, of orthogenesis, as Eimer expressed it.

As under different nutritive conditions the same variant may appear, the food itself cannot be the stimulus; there must be, as said above, another cause in the interior of the cells, which, for *B. prodigiosus*, seems only active in an alkaline environment.

On the other hand, the food, in a wider sense, has certainly a decisive influence on the variability, albeit indirectly. So we considered already the influence of the alkaline reaction of the medium if this alkali is produced by the microbes themselves. Another example is the following. As well in malt-wort as in bouillon the *viscosus* variant is regularly produced; but from malt-wort the *auratus* variant, which so readily takes rise in bouillon, is not obtained at all. Indeed, every culture condition gives a peculiar but constantly returning mixture of variants, differing both quantitatively and qualitatively from that found under any other conditions. But the real factors here active could not as yet be detected.

From the foregoing the following results may be derived.

1. *Bacillus prodigiosus* produces as well qualitative, as gain- and loss-variants,

all obtained with certainty by determined experiments; the stock-form is always found unchanged in the same culture with the variants.

All the variants are from their origin as constant as their stock.

The true factors which govern the variability in these experiments are still unknown.

2. By rapidly repeated re-inoculations and by other methods, normal form and variants may be kept constant, as it seems for an unlimited length of time.

3. All the variants vary in a way analogous to that of the normal form, thus, the *auratus*-variant produces an *auratus*-slimevariant, which must be considered as a gain-variant, and an *albus*-variant, which must be taken for a loss-variant.

The natural variety *B. Kieliensis*, which approaches the *auratus*-variant, also varies in an analogous way. The variation thus seems to be directed or orthogenetic.

4. Gain-atavism in loss-variants and loss-atavism in gain-variants, can be obtained whith certainty by dertermined experiments. Qualitative variants, too, may give rise to atavism.

5. The experimental variants of *B. prodigiosus* have not yet been found in nature. From another bacterium, *Bacillus herbicola*, a variant, took rise which I had before repeatedly isolated from nature and which I had taken for quite another species.

6. The variants of *prodigiosus*, and this holds good for many other microbes also, differ from each other and from their stock forms in the same way as closely related natural species or varieties do among each other. But their disposition to atavism is much more pronounced.

7. The sub-variants, e. g. the rose variants of different colour-intensity, arise in the same way as the chief variants and possess the same degree of constancy.

Ueber Emulsionsbildung bei der Vermischung wässeriger Lösungen gewisser gelatinierender Kolloide.

Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide, Band VII, 1910, S. 16—20.

Vor kurzem habe ich ein Enzym beschrieben[1]), welches aus Rohrzucker und aus Raffinose sowohl in Nährlösungen wie in Agarplatten einen nicht diffundierenden, offenbar grobmolekularen Schleim erzeugt, welcher die Polarisationsebene nach links dreht und mit Lippmann's Lävulan verwandt ist. Das Enzym wird durch einige allgemein verbreitete sporenbildende Erdbakterien hervorgebracht, wie Bacillus mesentericus (der Heubazillus), B. megatherium und besonders B. emulsionis, welcher in Rohrzucker selbst allgemein ist. Alle diese Bakterien könnten »Emulsionsbakterien« genannt werden.

Die Erscheinung ist sehr charakteristisch und besteht darin, daß in Rohrzuckernährlösungen durch die genannten Arten eine ausgesprochene, aus Schleimtröpfchen bestehende weißliche Emulsion entsteht, welche auf und in Agarplatten bis auf Zentimeterentfernung ringsum der Kolonien ebenfalls leicht sichtbar wird. Dieser Schleim ist nicht diffusionsfähig, muß deshalb an Ort und Stelle im Agar entstehen, was sicher durch ein Enzym stattfindet. Dieses Enzym wurde Viskosaccharase genannt, und ist vielleicht das erste Beispiel eines außerhalb der Zelle synthetisch wirkenden Enzyms. Daß hier wirklich Synthese stattfindet, folgt aus der Molekulargröße des Schleimes, welcher biologisch als Wandsubstanz aufzufassen ist.

Die so aufgedeckte Emulsionserscheinung veranlaßt mich, auf eine ähnliche Eigentümlichkeit gewisser anderer, und zwar gelatinierender Körper aufmerksam zu machen, welche ich allerdings schon vor einigen Jahren beschrieben habe[2]), doch für manchen Leser neu und nicht ohne Interesse sein dürfte.

1. Die Emulsionserscheinung beim Vermischen wässeriger Kolloidlösungen.

Wenn man nicht allzusehr verdünnte Lösungen von Agar und Gelatine in heißem Wasser, z. B. eine 10 proz. Gelatine- und eine 2 proz. Agarlösung, zu ver-

---

[1]) Viscosaccharase. An enzyme, which produces slime from cane-sugar. Proceedings Acad. of Sciences, Amsterdam, Januar 1910, S. 635 and May 1910. Mit Abbildung.

[2]) Ueber eine Eigentümlichkeit der löslichen Stärke. Centralbl. f. Bakteriologie 2. Abt. 2, 627 (1896).

mischen versucht, bemerkt man, daß dieses trotz längeren Schüttelns niemals vollständig gelingt, sondern daß diejenige Lösung, wovon man die geringste Quantität verwendet hat, als kleine, mikroskopisch nachweisbare Tröpfchen schwebend verbleibt in dem größeren Volum der zweiten Lösung. Oft enthalten die schwebenden Tröpfchen wieder kleinere Tröpfchen der anderen Lösung. Beim Erstarren wird dieser Zustand fixiert, ist dann aber etwas schwieriger zu beobachten, weil das Lichtbrechungsvermögen beider Körper nur wenig verschieden ist und weil dann relative Bewegungen ausgeschlossen sind, welche im flüssigen Medium die Differenz deutlicher machen. Allenfalls kann man sich jedoch bei sehr schiefer Beleuchtung von dem beschriebenen Tatbestande überzeugen.

Verwendet man anstatt Agar eine 10 proz. Lösung von löslicher Stärke, welche in einer 10 proz. Gelatinelösung aufgeschüttelt wird, so wird die Erscheinung noch deutlicher und kann, wie ich das früher beschrieben habe, zur Herstellung eines künstlichen »Zellgewebes« verwendet werden, worin der »Zellinhalt« aus Stärke, die »Zellwände« aus Gelatine bestehen, oder umgekehrt, je nachdem wenig Stärkelösung und viel Gelatine oder viel Stärke und wenig Gelatinelösung vermischt werden.

Ueber das genauere Maß der dabei in Betracht kommenden Mengenverhältnisse belehrt uns eine bemerkenswerte Mitteilung von Wa. Ostwald[1]), woraus hervorgeht, daß zwischen 74 und 26 Proz. der einen Lösung beide Zustände möglich sind, während nur dann, wenn der Prozentgehalt der einen Lösung oberhalb ca. 74 Proz. verbleibt, diese nur allein als »Inhalt«, daß heißt als disperse Phase vorkommen kann.

Weil das spezifische Gewicht einer Stärkelösung höher ist wie das der gleich konzentrierten Gelatine, kann man bei deren Vermischung auch beobachten, wie die aufgeschüttelten Tröpfchen der Stärkelösung beim ruhigen Stehen nach unten sinken und zur Bildung einer ziemlich klaren oberen Gelatineschicht veranlassen.

Vermittelst der Jodreaktion stellt sich heraus, daß die Gelatinelösung zwischen den Stärketröpfchen eine schwache blaue Färbung annimmt, so daß eine Spur Stärke als wirklich aufgelöst zu betrachten ist. Umgekehrt enthalten die Stärketröpfchen auch ein wenig Gelatine in wirklicher Lösung.

---

[1]) Beiträge zur Kenntnis der Emulsionen. Koll.-Zeitschrift 6, 103 (1910). Ostwald sagt, die Minimumzahl betrage ca. 22 Proz. Dieses ist jedoch nicht richtig, wie aus folgender Betrachtung hervorgeht. Stapelt man gleiche Kugeln zu einem drei- oder viereckigen Stapel aufeinander, wobei eine und dieselbe möglichst dichte Anordnung entsteht, so berührt jede Kugel 12 andere. Bringt man durch die 12 Berührungspunkte Tangentialebenen, so bilden diese zusammen einen regulären Rhomboeder. Stellt man die Seitenlänge dieses Rhomboeders gleich Eins, so wird dessen Inhalt gleich $\frac{16}{9}\sqrt{3}$, während der Inhalt der eingeschriebenen Kugel in dieser Einheit $\frac{8}{27}\pi\sqrt{6}$ wird. Das Verhältnis beider ist das gesuchte Maß, weil die Rhomboeder genau den Raum ausfüllen. Dieses Verhältnis ist aber $\frac{\pi}{3\sqrt{2}}$, was in Prozenten auskommt auf ca. 74,04 für die Kugelinhalte und ca. 26 für die Zwischenräume. Bei kubischer Aufstapelung wird das gleiche Verhältnis $\frac{\pi}{6}$, also ca. 52 Proz. für die Kugeln und ca. 48 Proz. für die Zwischenräume. (Vgl. hierzu die Notiz Wo. Ostwalds auf S. 64 dieses Heftes.)

Selbst sehr verdünnte Lösungen gut angefertigter löslicher Stärke[1]), z. B. von 0,1 Proz. und weniger, bleiben in Gelatine emulsioniert.

Mit Agar und Stärke gelingt die Reaktion nicht, offenbar weil sich nicht mehr wie 2 Proz. Agar lösen läßt, welches noch in der Stärkelösung gelöst bleiben kann. Auch dieser Umstand scheint mir sehr bemerkenswert.

Daß die »Emulsionserscheinung« eine ziemlich unerwartete ist, geht z. B. aus folgender Bemerkung Bütschli's hervor[2]): »Dieses für zwei wässerige Lösungen sehr eigentümliche Verhalten, das mir, offen gestanden, wenig wahrscheinlich vorkam, konnte ich zu meiner Ueberraschung . . . bestätigen.« Er gibt eine Beschreibung dieser Beobachtungen, ohne den meinigen neue hinzuzufügen und ohne eine Erklärung zu versuchen. Ich glaube, und eben darum erwähne ich Bütschli's Mitteilung, daß, wenn er sich mit diesen Versuchen eingehender beschäftigt hätte, er seiner »Schaumstrukturhypothese« eine ganz andere Form gegeben und besonders dieselbe nur auf leicht sichtbare mikroskopische Verhältnisse, und nicht auf amikroskopisches Gebiet angewandt haben würde.

---

2. Erstarren der Emulsionen.

Das Gemisch der zwei Kolloidlösungen, wie Agar und Gelatine, verhält sich beim Erstarren den reinen Lösungen beider Substanzen ganz ähnlich. Doch verdient in dieser Beziehung folgendes bemerkt zu werden.

Einige Beobachter nehmen an, daß der Erstarrungsprozeß einer Gelatine- oder Agarlösung auf die Verschmelzung der kleinen Tröpfchen der dispersen Phase zu größeren beruht, wodurch die tatsächlich beobachtete Vergrößerung der inneren Reibung beim Annähern des Erstarrungspunktes zu erklären wäre. Bei unserem künstlichen Gemisch ist jedoch, wenn man sich der Erstarrungstemperatur annähert, von einer solchen Verschmelzung nichts zu sehen, grobe und feine Emulsionen erstarren bei gleichen Temperaturen ohne jede bemerkbare Strukturveränderung. Es findet hier, soweit sichere Beobachtungen darüber Aufschluß geben können, nichts Besonderes statt. Ob die Tröpfchengröße gering oder beträchtlich ist und ob diese sich wohl oder nicht ändert, hat auf Erstarrungstemperatur und Viskosität jedenfalls nur einen sehr geringen Einfluß. Die Auffassung, daß das Erstarren gelöster quellbarer Körper im allgemeinen der Vergrößerung der hypothetischen amikroskopischen Tröpfchen der dispersen Phase parallel gehe oder darauf beruhe, kann ich deshalb zurzeit noch nicht als wahrscheinlich betrachten. Ueberhaupt scheint mir die Hypothese der Emulsionsstruktur der Kolloidlösungen, so wichtig und interessant dieselbe sicher ist, sehr schwach begründet. Nach meiner Ansicht sind konzentrierte Rohrzucker- oder Maltose-

---

[1]) Die Bereitung geschieht wie folgt: Kartoffelstärke wird mit starker Salzsäure übergossen und einige Zeit in der Kälte aufbewahrt. Nach einiger Tagen oder Stunden, je nach der Salzsäurekonzentration, kann die Stärke beim Kochen mit Wasser sich vollständig klar und durchsichtig lösen und beim Abkühlen porzellanweiß undurchsichtig erstarren. Zur Beseitigung der Salzsäure wird das Präparat mit sehr viel destilliertem Wasser ausgewaschen, woran anfangs ein wenig Natriumkarbonat zugegeben war.

[2]) Untersuchungen über mikroskopische Strukturen (Leipzig 1898), 251.

lösungen physikalisch vollständig vergleichbar mit konzentrierten Gelatine- oder Agarlösungen. So lassen die ersteren sich ebensogut wie die letzteren mit sehr konzentriertem Alkohol als Emulsionen präzipitieren, und doch glaube ich nicht, daß die Chemiker eine Zuckerlösung ohne weiteres als Emulsion auffassen. Warum dieses dann wohl bezüglich Agar, Gelatine oder Stärke geschehen muß, finde ich nicht deutlich. Doch will ich nicht verkennen, daß die mechanische Verkleinerung z. B. einer Agaremulsion in Gelatine schließlich zu einer Art Pseudolösung führen könnte, welche die Struktur einer Lösung eines Emulsionskolloids nach der geläufigen Vorstellung, besitzen könnte. Ob die mit der Krümmung steigende Oberflächenspannung der Tröpfchen an dieser Verkleinerung nicht bald ein Ende stellen sollte, scheint mir jedoch fraglich. Jedenfalls konnte ich beim Kochen meiner Emulsionen, wie lange auch fortgesetzt, die Tröpfchengröße schließlich nicht mehr verringern, immer blieben dieselben grob mikroskopisch.

---

3. Osmotisches Gleichgewicht in den Kolloidgemischen.

Betrachtet man die wasseranziehende Kraft der Tröpfchen inbezug auf ihre Umgebung, so ergiebt sich folgendes.

Zunächst muß bemerkt werden, daß eine eigentliche Diffusion bei unseren Versuchen von der einen in die andere Phase nicht stattfinden kann. Daraus folgt jedoch nicht, daß die relativen Konzentrationen unverändert bleiben sollten. Die Tröpfchen der Stärkelösung oder des Agars, welche in der Gelatinelösung schweben, müssen nämlich mit letzterer im osmotischen Gleichgewicht stehen oder jedenfalls nach einiger Zeit ein solches Gleichgewicht erreichen. So lange sie dieses nicht tun, muß notwendigerweise eine Wasserbewegung stattfinden, welche nach der Gelatinelösung gerichtet ist, wenn darin ein höherer osmotischer Druck herrscht, wie in den Stärke- oder Agartröpfchen, und umgekehrt. Im ersteren Falle müssen die Tröpfchen kleiner, im zweiten Falle müssen dieselben größer werden. Nennen wir eine solche Lösung eine »kritische«, wenn eine der beiden Phasen zu ca. 26 Proz. gegenwärtig ist, so muß, wenn das Volumen der Tröpfchen dieser Phase kleiner wird, unmöglich ein Zustand zu erreichen sein, worin dieser Anteil als disperse Phase hervortritt. Wird das Volum desselben jedoch vergrößert durch Wasserübertritt aus dem Dispersionsmittel in dieselbe, so wird sich das Verhalten umkehren können, denn wir erreichen nun das zwischen 26 Proz. und 74 Proz. gelegene Ostwald'sche Gebiet, wobei beide Phasen einander ersetzen können. Unter Umständen wird dieses zu einer experimentellen Entscheidung bezüglich der Größe des osmotischen Druckes solcher Lösungen führen können.

Im speziellen Falle der löslichen Stärke wird letzteres noch dadurch möglich sein, daß die Tröpfchen einer schwach konzentrierten Stärkelösung ein geringeres spezifisches Gewicht, wie diejenigen einer konzentrierten Gelatinelösung haben können, während wir früher sahen, daß konzentrierte Stärkelösungen viel schwerer wie Gelatine sind. Bei bestimmten Versuchsbedingungen werden also anfangs schwebende Stärketröpfchen nach unten sinken können infolge osmotischer Wasserentziehung.

---

4. Das Auflösen eines trockenen Kolloides in einer anderen Kolloidlösung.

Läßt man für die eine der beiden Lösungen den zu emulsionierenden Körper selber in trockenem Zustande an deren Stelle kommen, so ändern sich die zur Beobachtung kommenden Erscheinungen etwas. Versucht man z. B. trockene Gelatine in einer Agarlösung durch Erhitzen zu lösen, stößt man auf Schwierigkeiten, und wie lange man auch das Kochen fortsetzt, niemals bekommt man eine so gleichmäßige Verteilung, wie beim Schütteln schon vorher dargestellter Lösungen beider Substanzen. Beim Erstarren kann man auch keine gut zusammenhängende Platte bekommen, jedoch nur kleisterartige, unregelmäßige durchfeuchtete Massen, welche aus Klumpen und Kugeln bestehen.

Auch hier muß die Erklärung allerdings teilweise in der Unmöglichkeit der Diffusion des einen Kolloids in das andere gesucht werden. Jedoch sind dabei auch folgende Umstände zu berücksichtigen, welche mit dem Streben nach einem Quellungsgleichgewicht zusammenhängen.

Beim Kontakte z. B. von trockenem Agar mit flüssiger Gelatinelösung wird erstere Substanz der zweiten anfangs Wasser entziehen und dadurch stark aufquellen. Je weiter diese Quellung fortschreitet, desto schwächer wird die saugende Kraft des Agars jedoch werden, und bald wird der Augenblick kommen, daß das Agar die schwache, jedoch nicht ganz fehlende wasseranziehende Kraft der Gelatinelösung nicht mehr überwinden kann. Der Saugkraft des Agars setzen sich in diesem Falle offenbar zwei Kräfte entgegen: der osmotische Druck der 10 proz. Gelatinelösung, welcher denjenigen des nur bis ca. 2 Proz. löslichen Agars übertrifft, und zweitens der mechanische Widerstand, welchen die relativ konzentrierte Gelatinelösung auf die Volumvergrößerung des Agars, welche nur mit einer sehr schwachen Kraft stattfindet, ausübt.

Wie außerordentlich klein die Kraft ist, womit 2 Proz. Agar das Wasser zurückhält, geht aus folgender Beobachtung hervor. Wenn man aus einer frisch gegossenen und eben erstarrten Agarlösung ein Stück herausschneidet und dieses biegt, so wird man sehen, daß die leiseste mechanische Krümmung auf der konkaven Seite das flüssige Wasser in kleinen Tropfen heraustreten läßt. Ja die leiseste Berührung einer solchen Platte hat Wasseraustritt zur Folge; die geringste Erwärmung hat einen gleichen Effekt und nach meiner Meinung kann diese Erscheinung Licht werfen auf die Filtration flüssigen Wassers aus allerlei Pflanzenteilen und selbst die Saftsteigung in den Bäumen erklären, wobei allerdings angenommen werden muß, daß das Protoplasma, seiner Struktur nach, mit erstarrtem Agar zu vergleichen ist und die Kontraktilität desselben die für den Wasseraustritt notwendigen lokalen Druckverschiedenheiten hervorruft.

Auf ähnliche Weise wie bei den Lösungsversuchen von Agar in Gelatine oder umgekehrt wird man finden, daß Kartoffelstärkekörner, welche beim Verkleisterungsprozesse in reinem Wasser sehr schnell anschwellen (während nur eine Spur der Granulose in Lösung geht) beim Aufkochen z. B. in 10 proz. Gelatinelösung, viel weniger quellen, wie sich durch mikroskopische Messung leicht feststellen läßt.

---

5. Quellungsgleichgewicht und Doppelbrechung.

Obschon die nun zu besprechende Beobachtung nur indirekt mit der Emulsionserscheinung verbunden ist, glaube ich dennoch, daß die Erörterung derselben imstande ist, weiteres Licht auf die vielen hier in Betracht kommenden Fragen zu werfen.

Die oben erörterte wasseranziehende Kraft zwischen den beiden Phasen der Doppelkolloidemulsion besteht ebensogut im flüssigen wie im erstarrten Zustande. Daß dadurch Erscheinungen der Doppelbrechung des polarisierten Lichtes hervorgerufen werden können, ergiebt sich aus folgendem Versuche.

Man gieße in eine Glasschale eine dünne Schicht einer konzentrierten z. B. 20 proz. Gelatinelösung, man lasse erstarren und schneide aus der Platte ein Stück Gelatine heraus, welches entfernt wird. Das so erhaltene Loch wird nun vollgegossen mit einer verdünnten Gelatinelösung, z. B. eine von 2 bis 5 Proz., und zwar in der Weise, daß man wieder eine ebene Fläche bekommt. Man lasse wieder erstarren und lasse die heterogene Platte einige Zeit stehen.

Wie zu erwarten, entzieht die konzentrierte Gelatine der verdünnten Wasser; die zunächst sichtbare Folge davon ist die Entstehung eines erhabenen Walles neben der Trennungslinie in der 20 proz. Gelatine und einer tiefen Einsenkung in der 2 prozentigen. Dieses muß offenbar auf Wasserbewegung beruhen, wodurch die konzentrierte Gelatine verdünnt, die verdünnte konzentriert wird, und anscheinend muß dieses so lange fortgehen, bis auf beiden Seiten der Trennungslinie eine gleiche Gelatinekonzentration herrscht, weil erst dann Quellungsgleichgewicht herrschen kann. Die zweite Eigentümlichkeit, welche dabei zur Beobachtung kommt, besteht nun darin, daß die anfangs isotropen Gelatinen verschiedener Konzentration, beide doppelbrechend geworden sind, und zwar entgegengesetzt, so daß sich bezüglich polarisiertem Lichte die eine positiv, die andere negativ verhält. Offenbar ist die Spannungsverschiedenheit, welche infolge der Wasserbewegung entstanden ist, die Ursache dieser Doppelbrechung. Es herrscht nämlich in der geschwollenen Gelatine ein Druckzustand, in der eingesunkenen eine Spannung, wie das die für Druck empfindlichen Bakterienarten so überzeugend beweisen, indem dieselben in der Einsenkung parallel, im erhabenen Wall senkrecht auf die Trennungslinie wachsen, wenn man anstatt reiner Gelatine eine geeignete Nährgelatine verwendet.

Nach meiner Meinung handelt es sich hierbei um eine Erscheinung, welche eine Erklärung gibt von sehr vielen Fällen, wobei Doppelbrechung in organischen Strukturen beobachtet wird. Als solche wünsche ich die Stärkekörner anzuführen, welche bekanntlich aus Schichten ungleichen Wassergehaltes bestehen, und eben darin dürfte nach dem Vorstehenden ein ausreichender Grund für ihre Doppelbrechung gelegen sein und die Annahme doppelbrechender, kristallinischer Mizellen, welche Nägeli als notwendig vorausgesetzt hat, überflüssig werden.

---

6. Schlußbetrachtung.

Wäre der Vergleich der »Emulsionskolloide« mit den sichtbaren Emulsionen ohne weiteres richtig, dann müßte nach meiner Meinung eine zweiprozentige

Gelatinelösung sich ebensogut in ein 20 prozentige emulsionieren lassen, wie eine zweiprozentige Agarlösung. Dieses ist jedoch durchaus nicht der Fall: Gelatinelösungen von allen Konzentrationen mischen sich sofort miteinander, obgleich auch hier von Diffusion natürlich keine Rede sein kann. Daß diese Vermischung wirklich stattfindet, kann man leicht feststellen, wenn man die 20 prozentige Gelatine darstellt aus Gelatine, welche zuvor mit einem unlöslichen Farbstoff, wie Karmin oder Indigoblau, gefärbt ist; beim Vermischen der gefärbten Lösung mit der zweiprozentigen ungefärbten wird man sofortige und vollständige Durchdringung der beiden Flüssigkeiten beobachten. Es ist deshalb nicht recht einzusehen, warum eine Gelatinelösung an und für sich dann wohl aus emulsionierten »Tröpfchen« bestehen würde.

Nimmt man mit Wilhelm Ostwald[1]) an, daß bei einer bestimmten unteren Grenze der Tröpfchengröße die Oberflächenspannung abzunehmen beginnt, dann erscheint es nicht berechtigt, das Wort »Emulsion« noch anzuwenden auf ein Gemisch, worin die disperse Phase aus Tröpfchen besteht, deren Größe unterhalb dieser Grenze gelegen ist. Man ist dabei in ein neues Begriffsgebiet angelangt, und ein neuer Terminus wird notwendig, ebenso wie es notwendig ist, Moleküle und Ionen durch besondere Namen zu bezeichnen.

In einem solchen Sinne betrachtet, ist die neue Auffassung der sogenannten »Emulsionskolloide«, wie dieselbe so klar ausgesprochen und durchgeführt ist in Wo. Ostwald's »Kolloidchemie«, auch für mich annehmbar und der Ausdruck einer sehr fruchtbaren physikalischen Theorie. Sichtbare Emulsionen mögen diese Theorie anschaulich gemacht haben, ihre Eigenschaften sind ganz andere, wie diejenigen, welche die Kolloide charakterisieren. Und wenn es sich herausstellen sollte, daß die Eigenschaften der »Emulsionskolloide« nur erklärt werden können, wenn man annimmt, daß die Lösungen derselben aus kleinen wasserhaltigen Substanzmengen bestehen, welche im Dispersionsmittel schweben, dann müssen diese Substanzmengen derart charakterisiert sein, daß sie sich prinzipiell von den Tröpfchen der mikroskopischen Emulsionen unterscheiden.

---

[1]) Grundriß der allgemeinen Chemie, 4. Aufl., 545 (1909).

Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien.

Von M. W. BEIJERINCK mit Mitwirkung von D. C. J. MINKMAN.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Jena, II. Abt., XXV. Bd., 1910, S. 30—63.

Die Bildung von Stickoxydul beim Denitrifikationsprozesse ist schon durch die Entdecker dieses Vorganges beobachtet, nämlich durch Schlösing[1]) bei der Milchsäuregärung des Zuckers und der Urinfäulnis bei Gegenwart von Nitraten, und von Gayon und Dupetit[2]) bei Denitrifikationsversuchen mit Ammoncitrat bei Gegenwart von Asparagin und Kaliumnitrat.

Diese letzten Autoren haben zwei verschiedene denitrifizierende Bakterienarten, welche sie als α und β bezeichnen, durch Mittel, welche allerdings als nicht einwandfrei zu betrachten sind, wie sie meinen, in Reinkultur gebracht, und sie glauben festgestellt zu haben, daß α unter geeigneten Bedingungen sowohl Stickoxydul wie freien Stickstoff erzeugt, während β allein Stickstoff und kein Stickoxydul aus Nitraten erzeugen sollte. Der Wunsch, festzustellen, inwieweit diese Angaben richtig sind, und besonders die Frage, ob es vielleicht Mikroben gibt, welche dem Stickoxydul angepaßt sind und dieses exothermische, bei der Spaltung Wärme entwickelnde Gas als Energie- oder Ernährungsquelle verwenden können, gaben die erste Veranlassung zu den folgenden Zeilen. Die großen Quantitäten Stickoxydul, welche wir bei vielen unserer Versuche fanden, erregten unser Interesse und führten zu weiteren Fragen.

Merkwürdigerweise sind, nach der schon weit zurückliegenden Arbeit von Gayon und Dupetit keine neuen Erfahrungen über Stickoxydulbildung bei der Denitrifikation gemacht, offenbar weil das Gas von den späteren Untersuchern für Stickstoff gehalten wurde, wovon es sich auch nur unterscheiden läßt durch eine bestimmte Versuchsanstellung.

Ueber das Verschwinden des Stickoxyduls unter dem Einfluss von Mikroben oder Pflanzen überhaupt liegen keine Untersuchungen vor[3]).

Allgemeines und Methodisches.

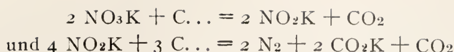
Die gegenwärtig gewöhnlich als richtig angenommene Theorie des Denitrifikationsprozesses kann durch die beiden folgenden Formen dargestellt werden:

---

[1]) Journal de Pharmacie et de Chimie, Sér. 4. T. 8. 1868. p. 213. Comptes rendus T. 66. p. 236.

[2]) Réduction des nitrates par les infiniment petits. (Station agronomique de Bordeaux. Nancy 1886. p. 51.)

[3]) Pfeffer, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Bd. 1. p. 399 u. 559. 1897.



$$2\ NO_3K + C\ldots = 2\ NO_2K + CO_2$$
$$\text{und } 4\ NO_2K + 3\ C\ldots = 2\ N_2 + 2\ CO_2K + CO_2$$

worin C... den Kohlenstoff der Kohlenstoffquelle bedeutet, und die Erfahrung zum Ausdruck kommt, daß es sich bei diesem Vorgange um eine innere physiologische Verbrennung handelt[1]).

Da wir das Stickoxydul als niemals fehlendes, oft als beinahe das Hauptprodukt der Denitrifikation erkannten, muß diese Theorie abgeändert werden, weil darin eben dieser prinzipielle Umstand außer acht bleibt.

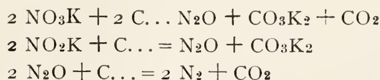
Ferner ist auch eine Ergänzung der Theorie notwendig geworden.

In ersterer Beziehung sei folgendes hervorgehoben: Nach unserer Auffassung muß der freie Stickstoff nicht auf Nitrit, sondern auf Stickoxydul zurückgeführt werden. Wir werden nämlich zeigen, daß das Oxydul sehr leicht durch die in der Denitrifikation vorkommenden Bakterien gespalten werden kann, und erinnern an den Umstand, daß diese Spaltung, wie gesagt, eine exothermische ist. Dieses, in Verbindung mit der Erfahrung, daß es leicht gelingt, den Nitratstickstoff nahezu quantitativ in Oxydul überzuführen, läßt es als unabweisbar erscheinen, die Oxydulphase zu betrachten als eine Stufe des Prozesses der Nitratreduktion, welche notwendig durchlaufen werden muß.

Daß dabei auch der Nitritphase eine wichtige Rolle zukommt, steht für uns ebenfalls fest, woraus sich ergibt, daß das Oxydul jedenfalls zum Teile, vielleicht zum größten Teile als eben aus Nitrit entstanden aufzufassen ist.

Daß dieses jedoch der alleinige Ursprung dieses Gases sein sollte, erachten wir als unwahrscheinlich, und glauben die Nitrifikationstheorie ergänzen zu müssen mit der, nach unserer Meinung unabweisbaren Annahme, daß ein Teil des Oxyduls direkt aus dem Nitrat hervorgeht.

Wir kommen demzufolge auf Grund unserer Erfahrungen und Erwägungen zu dem Schlusse, daß außer der Nitritbildung aus Nitrat die drei folgenden Reaktionen charakteristisch für die Denitrifikation sind:



$$2\ NO_3K + 2\ C\ldots\ N_2O + CO_3K_2 + CO_2$$
$$2\ NO_2K + C\ldots = N_2O + CO_3K_2$$
$$2\ N_2O + C\ldots = 2\ N_2 + CO_2$$

Daß diesen drei letzten Formeln eine größere Wahrscheinlichkeit zukommt wie den obengenannten, wobei zu gleicher Zeit 4 Moleküle Nitrit und 3 Moleküle Kohlenstoff an der Reaktion teilnehmen sollen, liegt auf der Hand.

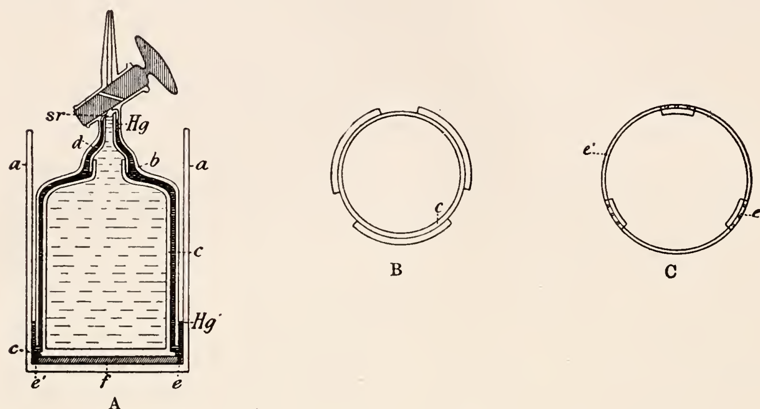
Weil das Stickoxydul in Wasser sehr löslich ist (0,67 Vol. bei 20° C), müssen die darauf zu untersuchenden Gärungsgase oberhalb Quecksilber, oder besser oberhalb einer gesättigten Chlorcalciumlösung, worin bei Zimmertemperatur weniger wie drei Volumprozent auflösen, gesammelt werden. Die dafür bei vielen Versuchen verwendete Einrichtung ist in Figur 1 dargestellt.

Zweck dieses Apparates war, das Gas oberhalb Quecksilber zu sammeln und dabei einen so klein wie möglichen Quecksilberspiegel zu bekommen, um die Bildung des giftigen Dunstes dieses Metalles im Apparate und zu gleicher Zeit das Gewicht des Ganzen minimal zu machen. Die Konstruktion ist folgende:

---

[1]) Für die weitere Literatur über die Denitrifikation verweise ich auf: B. Lemmermann, Kritische Studien über Denitrifikationsvorgänge. Jena 1900, und A. Maassen, Arbeiten aus dem Gesundheitsamte. Bd. 18. 1901. p. 23.

Zu Boden des Glases a Fig. 1 A ist der eiserne Ring e vermittelst einer Gipsschicht f in der Weise gefestigt, daß nur die drei Haken e Fig. 1 C herausragen. Innerhalb des Glases a und auf dem Gipsboden wird die Kulturflasche c aufgestellt, deren Boden einen horizontalen Kragen mit drei Ausschnitten hat, welche letztere die Haken des eisernen Ringes durchlassen und bei Drehung der Flasche



Figur 1. Apparat von Minkman zum Auffangen von Gärungsgasen mit minimalem Quecksilbervolum und minimalem Quecksilberspiegel.

A. Längsschnitt a Becherglas; b Gasglocke mit Hahn und Tubulatur; c Gärungsflasche mit Glashelm d; e eiserner Ring mit 3 Höckern zur Befestigung der Gärungsflasche; f Gipsschicht zur Befestigung des eisernen Ringes am Boden des Becherglases; Hg, Hg', Quecksilber.

B. Bodenansicht der Gärungsflasche, um die drei Einschnitte des Kragens zu zeigen, wodurch die drei Höcker des eisernen Ringes passieren können, die beim Drehen der Flasche diese mit »Bajonettverschluß« am Boden halten.

C. Der eiserne Ring mit den drei Haken e, welche durch die Einschnitte des Kragens des Bodens (B) der Flasche passieren können.

diese durch Bajonettverschluß an dem Boden von a befestigen, so daß das einzugießende Quecksilber die Kulturflasche c nicht heben kann. Diese Flasche ist mit aufgeschliffenem, weitem Glashelm d abgeschlossen, aus dessen geräumiger Oeffnung das Gas, ohne allzusehr überzuschäumen entweichen kann. Die Gasempfangsglocke b paßt ziemlich genau um die Flasche c, so daß, wenn das Quecksilber in das Glas a gegossen und durch den Hahn der Empfangsglocke b bis zum Rande des Glashelmes d aufgesogen wird, nur ein schmaler, ringförmiger Quecksilbermeniskus Hg-Dunst abgeben kann in den schädlichen Raum sr, welcher von Anfang an etwas Luft enthält. Wie das Gas die Glocke b aufheben und für die Gasanalyse gesammelt werden kann, ist aus den Figuren klar. Obschon es nicht zu vermeiden ist, daß der innere Quecksilbermeniskus sich mit der etwas überschäumenden Kulturflüssigkeit befeuchtet, läßt sich mit dem Apparat doch befriedigend arbeiten.

Anstatt Quecksilber kann in diesem Apparate eine gesättigte Chlorcalciumlösung verwendet werden.

In anderen Fällen wurde die Gärung einfach in einer geschlossenen Stöpselflasche eingeleitet, und sobald die Gasentwicklung begann, der Stöpsel abgenommen und durch einen Gummistöpsel mit Gasableiter ersetzt, was leicht ohne Infektion geschehen kann.

Der qualitative Nachweis des Stickoxyduls geschieht dadurch, daß man nach der Entfernung etwa vorhandener Spuren von Sauerstoff vermittelst der Phosphorpipette einige elektrische Funken durchschlagen läßt, während das Gas sich oberhalb der Stärke-Jodkalium-Salzsäurelösung befindet. Ist Stickoxydul vorhanden, so entsteht Stickoxyd, und wenn man eine Luftblase hineinläßt NO_2, welches Jod frei macht und die Flüssigkeit unter dem Gase tief blau färbt. Auch wird dabei direkt ein wenig NO_2 gebildet.

Bestehen mehr als 70 Proz. des Gases aus Stickoxydul, so kann ein glühender Holzspan darin entflammen. Bei einem Gehalte zwischen 50 Proz. und 70 Proz. entflammt ein Holzspan zwar nicht, doch verbleibt er in dem glühenden Zustande.

Für den quantitativen Nachweis von Stickoxydul in Gasgemischen kommen vor allem drei Methoden in Betracht. Ist mehr als 25 Proz. gegenwärtig, so kann das Gemisch, wenn es mit dem gleichen Volum Wasserstoff versetzt ist, durch den elektrischen Funken explodieren; ist weniger vorhanden, so muß das Gas nach Vermischung mit Knallgas zur Explosion gebracht[1]), oder nach Vermischung mit einem bekannten Volum Wasserstoff in der Drehschmidt'schen Platinkapillare verbrannt werden. Weil letzteres Verfahren einfach und allgemein anwendbar ist, wurde dasselbe bei unseren späteren Versuchen stets gebraucht.

Die Gasanalyse findet dann wie folgt statt: Zunächst wird die Kohlensäure absorbiert und die Volumverminderung abgelesen: der Gasrest wird nun mit dem gleichen Volum Wasserstoff vermischt und durch die erhitzte Platinkapillare geführt, worin das Stickoxydul verbrennt nach der Formel:



$$N_2O + H_2 = H_2O + N_2$$

und also eine Kontraktion des Volums auf die Hälfte stattfindet. Die tatsächlich abgelesene Kontraktion gibt also an, wieviel Stickoxydul gegenwärtig war. Der Rest der ursprünglichen Menge ist der von vornan gebildete freie Stickstoff.

Falls etwas Sauerstoff im Gasgemische vorkommt, wird dieser nach der Kohlensäureabsorption mit der Phosphorpipette bestimmt.

Bei unseren in dieser Abhandlung betrachteten Versuchen waren Stickoxyd und Stickstoffperoxyd niemals gegenwärtig, doch haben wir diese Gase in geringer Menge bei der Denitrifikation mit Melasse gefunden, trotzdem die Reaktion des Nährmediums alkalisch war.

Schließlich sei noch bemerkt, daß 1 g KNO_3 bei vollständiger Denitrifikation ca. 112 ccm Stickoxydul oder ebensoviel freien Stickstoff erzeugen kann, während diese Zahl für Ammonnitrat 140 ccm pro g beträgt.

---

[1]) Hempel, Gasanalytische Methoden. 3. Aufl. p, 176. 1900. Kemp's Methode der Verbrennung mit Kohlenoxyd ist etwas umständlicher.

Kapitel 1. Bildung von Stickoxydul durch Bakterien.

1. Einrichtung von Denitrifikationsversuchen im Allgemeinen.

Es gibt eine große Menge von Versuchen, wobei Denitrifikationserscheinungen stattfinden können, weil die verschiedenartigsten Kohlenstoffquellen sich dafür als geeignet erweisen, wenn zugleich irgend ein Nitrat gegenwärtig ist. Wichtig ist, zu beachten, daß der Vorgang am schnellsten bei Temperaturen von 30° bis 37°, je nach den wirksamen Arten, verläuft, und unterhalb dieser Temperaturen sehr verzögert wird. Bei geeigneter Versuchseinrichtung kann man schon innerhalb ein oder zweier Tage reichliche Gasmengen sammeln. Gewöhnlich bekommt man gute Resultate, wenn die Kulturflüssigkeit eine Flasche mit gut eingeschliffenem Stöpsel gänzlich anfüllt, sodaß die gelöste Luft dann offenbar zureichend ist, um den immer notwendigen »Reizsauerstoff« heranzuführen. Doch hat sich herausgestellt, daß eine Luftblase unter dem Stöpsel für bestimmte Arten notwendig ist. So für den in Gartenerde ziemlich seltenen, carotinhaltigen Bacillus vulpinus. Immer muß man bedenken, daß es überhaupt keine absoluten Anaeroben giebt, und daß selbst die Nitratgruppe nicht imstande ist, den für alles Leben notwendigen »Reizsauerstoff« abzugeben, dafür sind größere oder kleinere Quantitäten freien Sauerstoffs unumgänglich notwendig. Eben bei denitrifizierenden Bakterien ist der Nachweis dieses Naturgesetzes von besonderer Leichtigkeit. So z. B. für B. Stutzeri. Wenn man nämlich diese, die Gelatine nicht verflüssigende Art in großer Individuenzahl mit Bouillon, 1 Proz. Kaliumnitratgelatine, welche durch längeres Kochen vollständig sauerstoffrei gemacht ist, vermischt, in einer tiefen Reagentienröhre erstarren läßt, und etwas unterhalb der Schmelztemperatur der Gelatine kultiviert, so wird man sehen, daß in der Tiefe nur im Anfang des Versuches etwas Wachstum und Gasbildung bemerklich sind, welche jedoch alsbald schwinden, während mehr nach oben diese Prozesse regelmäßig weitergehen. Anfangs waren offenbar selbst in der Tiefe noch zureichende Mengen Reizsauerstoff gegenwärtig, die aber alsbald aufgebraucht sind, wobei das weitere Wachstum trotz des reichen Salpetergehaltes unmöglich wird.

Bei dieser Art bemerkt man dann zu gleicher Zeit in der Gelatine in geringer, aber deutlicher Entfernung von der freien Oberfläche ein Niveau, wo die Kolonien kräftiger wachsen wie darüber (kräftiger also wie im Meniskus selbst) und wie darunter, was auf Mikroaërophilie beruht, welche ebenfalls bemerkbar wird durch das Zustandekommen einer »spirillenartigen« Atmungsfigur bei Bewegungsversuchen mit dem mikroskopischen Präparat in der Glaskammer.

Doch kehren wir zur Denitrifikation selbst zurück. Läßt man, wenn es nicht auf große Genauigkeit ankommt, den Vorgang in einer gewöhnlichen Stöpselflasche verlaufen, so findet zunächst ein Auspressen von Schaum statt, wodurch zwar ein Teil der Flüssigkeit verloren geht, welcher aber durch das Gas ersetzt wird. Wünscht man das Gas zu sammeln, so wird der Glasstöpsel durch einen Kautschukstöpsel mit Gasableiter ersetzt und oberhalb der gesättigten Chlorcaliumlösung aufgefangen.

Als sehr geeignete Kohlenstoffquellen für denitrifizierende Bakterien sind

Bouillon einerseits und ferner die Salze der organischen Säuren erkannt, besonders diejenigen mit Kalium, Natrium und Ammon als Basen.

Auch der gewöhnliche Aethylalkohol ist eine gut geeignete Kohlenstoffquelle. Kultiviert man bei Luftabschluß in 100 Leitungswasser, 0,5 Alkohol, 1 KNO_3, 0,05 K_2HPO_4 bei 37^0 und mit Gartenerde als Infektionsmaterial, so erhält man eine kräftige Denitrifikation, welche bei der Überimpfung (wenigstens im Winter 1909 zu Delft) eine schöne, blaugrüne Flüssigkeit lieferte, worin Bacillus pyocyaneus vorherrschte.

Als weniger geeignet ergaben sich die Kohlenhydrate und die höheren Alkohole. Doch können mit Glyzerin, Mannit und Zellulose sehr kräftige Denitrifikationen erhalten werden, wenn man übrigens geeignete Versuchsbedingungen einführt.

Wenn man z. B. eine Flasche füllt mit Leitungswasser, 2 Proz. Mannit, 1 Proz. KNO_3 und 0,05 Proz. K_2HPO_4, infiziert mit viel Gartenerde und kultiviert bei 37^0 C, so entsteht nach 24 Stunden eine heftige Denitrifikation mit höchst bemerkenswerten Bakterien. Impft man davon über in die gleiche Nährlösung, so bekommt man jedoch keine weitere Denitrifikation; die ganze, sehr eigentümliche Flora der Rohkultur verschwindet dabei.

Ersetzt man unter übrigens gleichen Bedingungen den Mannit durch 2 Proz. Glyzerin, so erhält man ebenfalls eine heftige Denitrifikation, welche auch bei der Überimpfung wieder hervortritt, jedoch mit beträchtlichen Änderungen in der Flora, verglichen mit derjenigen der Rohkultur.

Wird Zellulose (Filtrierpapier) unter den bezeichneten Bedingungen gegeben, so bekommt man ein Gemisch von zwei Denitrifikatoren, nämlich Bacillus nitrogenes (= B. Stutzeri) und eine eigentümliche, die Zellulose zersetzende Art; doch ist der Vorgang sehr langsam, wenn auch lange dauernd[1]).

Merkwürdigerweise entsteht in allen diesen Fällen kein Wasserstoff.

Verwendet man 2 Proz. Glukose und 1 Proz. KNO_3, so entsteht mit frischer Erde als Impfmaterial eine starke Buttersäuregärung, und die Gärungsgase enthalten neben Stickstoff und Kohlensäure auch Wasserstoff, aber kein Stickoxydul. Eine Überimpfung vertragen solche Gärungen mit Zucker jedoch nicht. Es läßt sich nachweisen, dass in diesen Fällen Ammon aus der Nitratgruppe entsteht, doch findet sich unerwarteterweise in den Gärungsgasen während der zuletzt eintretenden Ammonphase einer solchen »Glukose Nitrat-Denitrifikation« kein Wasserstoff mehr, dagegen freier Stickstoff, selbst zur Zeit, wo die Nitrat- und Nitritreaktionen schon verschwunden sind.

Weil die Möglichkeit des Zustandekommens der Buttersäuregärung bei Gegenwart von Salpeter nicht uninteressant ist, will ich hier noch folgendes Beispiel anführen: Es wurden aus 2 g Glukose 2 g Kreide, 1 g KNO_3, 0,05 g $ClNH_4$ und 0,05 K_2HPO_4 in 100 ccm Leitungswasser, bei 37^0 C in geschlossenen Flaschen kultiviert, mit 2 g Gartenerde als Impfmaterial, vom 14.—16. Juni nahezu 500 ccm Gas gesammelt von der mittleren Zusammenstellung 53 Proz. CO_2, 32 Proz. H_2 und 15 Proz. N_2. Aus einer ähnlichen Kultur ohne KNO^3 wurden in derselben Zeit an Gas erhalten ebenfalls ungefähr 500 ccm von der mittleren Zusammen-

[1]) G. van Iterson, Akad. van Wetensch. Amsterdam. Bd. 2. 1903. p. 686. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. 1904. Bd. 4 p. 1. 689).

stellung 50 Proz. CO_2 und 50 Proz. H_2. Es waren also im ersteren Falle 75 ccm weniger Wasserstoff und Kohlensäure gebildet wie im zweiten, doch zeigte das mikroskopische Bild in beiden Flüssigkeiten sehr viel Granulobacter, und bei der aëroben Aussaat wurden aus beiden Gärflüssigkeiten Gärungsbakterien aus der Coligruppe erhalten.

Die mit Glukose, Stärke, Rohrzucker und ähnlichen Kohlenstoffquellen erzeugten Buttersäuregärungen sind bei Gegenwart von Nitraten die einzigen bisher bekannten Denitrifikationen, wobei kein Stickoxydul entsteht. Die Frage verdient eine weitere Untersuchung.

Weil beim Fortlassen der Ammonsalze bei diesen Versuchen aus dem Nitrat selbst Ammon gebildet wird, ist der allgemeine Verlauf derselben in beiden Fällen ähnlich, doch erscheint Zufügung des Ammonsalzes geeignet, den Versuch zu vereinfachen.

Verwendet man neben Glukose 8 Proz. KNO_3, so entsteht keine Buttersäure, sondern eine heftige Nitroxusgärung, und das Gärungsgas enthält keinen Wasserstoff, jedoch ca. 90 Proz. N_2O.

Mit Formiaten (und mit Ureum) ist Denitrifikation, wie es scheint, unmöglich, wenigstens sind bisher alle Versuche in dieser Richtung mißlungen.

Mit 2 Proz. Natriumacetat, 1 Proz. KNO_3 und 0,5 Proz. K_2HPO_4 in Leitungswasser entsteht bei 37° C eine eigentümliche Flora von Sporenbildnern, welche das Überimpfen schlecht verträgt.

Mit Natriumpropionat gelingt die Denitrifikation viel besser. Hat man mit Gartenerde geimpft und impft man über in die gleiche Nährflüssigkeit, so bekommt man eine schön grünblaue Lösung, worin als Hauptdenitrifikator Bacillus pyocyaneus (Delft, 1909).

Ebenso wie Alkohol ist Propionat also eine geeignete Substanz, um letztere Bakterienart in Erde nachzuweisen. Mit freier Stearinsäure erhielten wir im Sommer und Herbst 1908 ein ähnliches Resultat, wie mit Propionat; nicht jedoch im Jahre 1909, obschon auch dann, wie wir sehen werden, B. pyocyaneus auf andere Weise leicht aus Erde zu erhalten war. Es muß also im letzteren Jahre in unserer Umgebung eine andere Varietät dieser Art verbreitet gewesen sein, wie früher.

Als besonders gute Nährsubstanzen für die Denitrifikation ergaben sich die Salze der Citronensäure, Weinsäure und Äpfelsäure; an Artenreichtum zeichneten sich die Seignettesalzkulturen (Kaliumnatriumtartrat) aus. So erhielten wir aus 5 Proz. Lösung dieses Salzes mit 2 Proz. KNO_3, unter den schon mehrfach genannten Bedingungen gärend, bei der Aussaat auf Fleischbouillonagar nicht weniger wie 5 Denitrifikatoren, worunter B. pyocyaneus, B. nitrogenes (in 2 Varietäten), eine Varietät von B. vulpinus und ein früher noch nicht beobachteter Micrococcus; daneben noch ein paar Arten, welche nicht denitrifizierten.

Anderseits gelang es[1]), durch die Verwendung von 2 Proz. Calciumtartrat und den relativ hohen Salpetergehalt von 2 Proz., aus Kanalwasser bei der Temperatur von 28° und durch wiederholtes Überimpfen zu einer sehr weitgehenden »Reinigung« der Kultur und schließlich beinahe zu einer Reinkultur zu kommen

---

[1]) G. van Iterson, Ophoopingsproeven met denitrificeerende Bakteriën. (Verhand. Akad. v. Wetensch. Amsterdam. Deel 11. 1903. p. 3.)

von B. nitrogenes (B. Stutzeri)[1]), wobei sowohl der Kalk als auch der hohe Nitratgehalt, weil für viele Bakterien schädlich, als »reinigende« Faktoren zu betrachten sind.

Wie gut die Denitrifikatoren des Meeres sich durch Calciummalat anhäufen lassen, zeigte Herr Gran[2]).

Was sich mit Ammoncitrat und Salpeter bei 37° erreichen läßt, ist in der klassischen Untersuchung von Gayon und Dupetit (l. c.) ausführlich gezeigt.

Von stickstoffhaltigen Kohlenstoffquellen sind außer Pepton die folgenden für unseren Zweck bemerkenswert: Zunächst die Harnsäure und das Asparagin, welche sich besonders gut eignen für die Anhäufung bei 37° des so vielseitigen und so allgemein verbreiteten Bacillus pyocyaneus. Die Überimpfungen in der Asparaginlösung (0,05 Proz. Asparagin, 1 Proz. KNO_3, 0,5 Proz. K^2HPO_4) schlagen jedoch bisweilen fehl. Auch kann es vorkommen, daß sie sich sehr schön rot färben, ohne sich stark zu trüben. Obschon die Reaktion solcher Kulturflüssigkeiten alkalisch bleibt, erhält man daraus auf Platten Reinkulturen von B. pyocyaneus. Weil das Pyocyanin sich zwar rot färbt mit Säuren, jedoch blau bleibt mit Alkalien, muß der hier gebildete Farbstoff von Pyocyanin verschieden sein (Pyoerythrin).

Ferner muß hier das Glykokoll genannt werden, wovon 2,5 Proz. mit 1 Proz. Salpeter mit Gartenerde bei 37° wundervolle zoogloen oder sarcineartige Bakterienklumpen liefert, welche wahrscheinlich zu der sporenbildenden, unter diesen Bedingungen sich gänzlich deformierenden Art gehören, welche später als Bacillus nitroxus besprochen werden soll, woneben sich aber auch noch andere Arten entwickeln.

Auch 0,5 Proz. Alanin mit 1 Proz. KNO_3 ist für Denitrifikation bei 37° ausgezeichnet und interessant wegen der gemischten, an Sporenbildnern reichen Flora.

In einer 0,5 Proz. Glukosaminlösung mit 1 Proz. KNO_3 und Gartenerde als Impfmaterial entstand bei 37° C zu unserer Überraschung eine heftige Granulobactergärung. Die prächtigen, plumpen, stark beweglichen Stäbchen färbten sich mit Jod, nur mit Ausnahme eines Poles tiefblau. Beim Überimpfen in gleicher Lösung entwickelte sich, gemäß der Erwartung, überhaupt keine weitere Gärung.

Manche dieser Angaben beziehen sich auf noch nicht gänzlich durchgearbeitete Versuchsreihen, und werden hier nur angeführt, weil es Typen sind, wovon jeder in verschiedenen Richtungen einiges Interesse hat.

Als besonders geeignet für Denitrifikationsversuche haben die verschiedensten Autoren Nitrat-Bouillon erkannt, wobei entweder Fleisch oder andere tierische Substanzen für die Anfertigung verwendet wurden. Auch wir haben wegen verschiedener Ursachen eben damit experimentiert, und zwar besonders deshalb, weil man aus der Literatur den Eindruck bekommt, daß daraus kein Stickoxydul gebildet wird, und dieses Gas nur unter ganz besonderen Bedingungen aus Ammon-

---

[1]) Migula, System der Bakterien. Bd. 2. 1900. p. 793 (Bacillus nitrogenes). Lehmann und Neumann, Bakteriologische Diagnostik. p. 237. 1906 (Bacillus Stutzeri).

[2]) Studien über Meeresbakterien. I (Bergens Aarbog. 1901. No. 10.).

citrat-Asparagin-Nitrat entstehen sollte. Wir haben aber, dieser Auffassung ganz entgegengesetzt, gefunden, daß die Nitrat-Bouillon wohl die vorzüglichste Nährlösung ist, um den Vorgang der Stickoxydulbildung zu studieren.

Der Bakterienzustand in den angeführten Rohkulturen ist außerordentlich verschieden, und, wie gesagt, noch nicht vollständig durchgearbeitet. Folgende Regel läßt sich mikroskopisch nachweisen als allgemein zutreffend: Bei einem Nitratgehalt von 5 Proz. bis 12 Proz. herrschen, bei den beschriebenen Bedingungen, sowie auch in Nitratbouillon bei 37° längere, bewegliche, sporenbildende Stäbchen vor, welche zu mehreren nahe verwandten Arten oder Varietäten zu bringen sind, die den anaëroben Keimen der eigentlichen stinkenden Eiweißfäulnis sehr nahe stehen. Bei einem geringeren Salpetergehalt, von z. B. 0,1 Proz. à 1 Proz. und bei niederer Temperatur, zeigt das mikroskopische Bild zwar in der Rohkultur mit Bouillon, wenigstens im Anfang der Kultur, ebenfalls Sporenbildner, doch in den Überimpfungen und in den Kulturen mit Laktaten, Malaten, Tartraten und Citraten als Kohlenstoffquellen wohl unter allen Bedingungen vorwiegend schnell bewegliche, kleine Stäbchen, während die Sporenbildner dabei zurücktreten.

Das Resultat der Kulturversuche nach dem Plattenverfahren zeigt, daß die Flora in allen Fällen, wobei wenig Nitrat gebraucht wird, außer den eigentlichen denitrifizierenden, auch einige nicht denitrifizierenden Arten, und zwar die letzteren scheinbar in Mehrheit oder großer Mehrheit enthält, woraus jedoch in Verbindung mit genauer mikroskopischer Untersuchung geschlossen werden muß, daß die in Betracht kommenden denitrifizierenden Bakterien auf unseren Platten nur zum kleinen oder sehr kleinen Teil Kolonien erzeugen.

Bei jedem verschieden angeordneten Versuche ist die Artenzahl im ganzen ziemlich gering, meistens herrscht dabei nur eine wohl und eine nicht denitrifizierende Art vor. Unter sehr günstigen Ernährungsbedingungen ist die Artenzahl größer, wovon wir ein Beispiel kennen lernten in dem Seignettesalz (Kaliumnatriumtartrat), welches eine besonders gute Kohlenstoffquelle ist.

Weil es schwer ist, aus den Rohkulturen zu einer bestimmten Ansicht bezüglich der Verbreitung und Allgemeinheit der Denitrifikatoren in den Rohmaterialien zu kommen, haben wir viele Versuche gemacht zu einer direkten Erkennung der Kolonien dieser Bakteriengruppe auf den Kulturplatten, wobei wir sowohl die Alkali- wie die Gasbildung als charakteristische Reaktion für das Auffinden derselben zu verwenden suchten, allein bisher vergebens. Vorläufig sind wir deshalb auf Anreicherungen in bestimmten Nährlösungen angewiesen, wobei festgestellt wird, mit welcher Minimumquantität Impfmaterial und Denitrifikation zu erhalten ist.

2. Bildung von Stickoxydul in den Rohdenitrifikationen.

Von der reichlichen Bildung von Stickoxydul, welche bei gut eingerichteten Versuchen stattfindet, kann man sich auf folgende einfache Weise überzeugen:

Man fülle eine gutschließende Stöpselflasche mit eingeschliffenem Glasstöpsel von ca. 200 ccm gänzlich mit Fleischbouillon, welche mit 8 Proz. Kaliumnitrat

versetzt ist, und infiziere mit einer reichlichen Menge Gartenerde, z. B. 10 oder 20 g. Stellt man die Flasche dann bei 37°, so findet man am anderen oder am nächstfolgenden Tage, daß durch ein sehr starkes Bakterienwachstum eine profuse Schaumbildung stattgefunden hat und ein beträchtlicher Teil der Kulturflüssigkeit zwischen Halswand und Stöpsel der Flasche durch einen eigentümlichen Kapillarprozeß nach außen befördert ist, während der dadurch freigewordene Raum sich mit dem Gärungsgase angefüllt hat, indem der lose aufgesetzte, aber dennoch gut anschließende Stöpsel, infolge des inneren Druckes wohl Füssigkeit aus-, jedoch keine Luft hineingelassen hat. Das Gas ist ein Gemisch von Stickoxydul, Stickstoff und Kohlensäure, während der 24 ersten Stunden gewöhnlich mit weniger, nach 48 Stunden und später, in dem hier betrachteten Falle mit ca. 90 Proz. Stickoxydul. Wird die Flasche vorsichtig geöffnet und ein glühender Holzspan hineingebracht, so sieht man denselben sich plötzlich entzünden. So lange noch genügend Nitrat und organische Nahrung vorhanden sind, um die Gärung lebhaft im Gange zu halten, kann dieser Versuch mit gleichem Erfolge wiederholt werden, jedoch verringert sich der Gärvorgang infolge der Alkalikarbonatbildung.

Erhöht man den Salpetergehalt der Bouillon auf 10 Proz., ja auf 12 Proz., so ist der Verlauf des Versuches derselbe, wie bei 8 Proz. Vermindert man diesen Gehalt dagegen auf 5 Proz., 2 Proz. oder 1 Proz., so vermindert sich der Gehalt der Gärungsgase an Stickoxydul bis auf ca. 50 Proz., mit gleichzeitiger Zunahme des Stickstoffgehaltes, so daß es nahe liegt, anzunehmen, daß zwar zuerst Stickoxydul entsteht, daß dieses aber unter Sauerstoffabgabe sich weiter reduziert, eine Ansicht, welche, wie wir später sehen werden, im allgemeinen sicher richtig ist. Bekanntlich entstehen die Gärungsgase ausschließlich aus der Nitratgruppe, während die Amid- und die Ammongruppe nicht angegriffen werden. Ersetzt man das Kaliumnitrat durch Ammonnitrat, so verändert sich deshalb der Verlauf des Versuchs nicht. Der naheliegende Gedanke, es könnte in diesem Falle eine katalytische Spaltung des Ammonnitrats zu Stickoxydul und Wasser zu stande kommen, ergibt sich also als unrichtig. Ebensowenig findet unter dem Einfluß der Mikroben eine Katalyse von Ammonnitrit unter Abspaltung von freiem Stickstoff statt.

Dennoch kann die Verwendung von Ammonnitrat nützlich sein, wenn es sich darum handelt, der schädlichen Beeinflussung des Denitrifikationsprozesses durch das Alkali, welches dabei entsteht, vorzubeugen. Aus dem Ammoncarbonat kann nämlich durch Hinzufügung des schwer löslichen und an sich unschädlichen Magnesiumhydrophosphats ($MgHPO_4 . 2 H_2O$) das Ammon als unlösliches NH_4MgPO_4 präzipitiert werden, während die Kohlensäure entweicht, was bei den fixen Carbonaten nicht gelingt[1]).

Bestimmt man den Gehalt an Stickoxydul in den Gärungsgasen der früher in kursorischer Übersicht genannten Denitrifikationen, so findet man, daß dieser Körper nur mit einer Ausnahme stets vorhanden ist, wenn auch in sehr wechselnden Mengenverhältnissen. Die Ausnahme betrifft die denitrifizierenden Buttersäure-

---

[1]) Liebert, Akad. van Wetensch. Amsterdam, 6. Mei 1909. p. 990.

gärungen, wobei neben Kohlensäure und Wasserstoff nur Stickstoff entsteht. Wir sehen also, daß es sich bei dem Stickoxydul um einen Körper handelt, welcher im Denitrifikationsprozesse sehr oft ein ebenso wichtiges und in gewissen Fällen ein viel wichtigeres Produkt ist, wie der Stickstoff selber. Es muß daher sehr auffallend erscheinen, daß Gayon und Dupetit die Haupteinteilung ihrer Arbeit darauf gründen, daß nur bei der gleichzeitigen Verwendung von Ammoncitrat und Asparagin als Kohlenstoffquelle Stickoxydul entsteht und niemals anders. Bei ihren zahlreichen Versuchen mit Bouillon sollte das Gas sich nicht gebildet haben. Wie dieser vollständige Widerspruch mit unseren Resultaten zu erklären ist, und wie es möglich ist, daß so gute Beobachter sich derweise irren konnten, wird sich später ergeben.

3. Beispiele von Analysen des Gases der Rohdenitrifikationen.

Weil es sich also herausgestellt hat, daß die bisherige Auffassung des Denitrifikationsprozesses gewissermaßen eine prinzipielle Veränderung erfahren muß, erscheint es angemessen, einige unserer Versuche genauer zu beschreiben, um die quantitativen Verhältnisse für verschiedene Fälle zu beleuchten.

In einem Versuche mit Fleischbouillon (20 g Ochsenfleisch, 100 g Wasser viele Stunden gekocht und digeriert) mit 1 Proz. NH_4NO_3, infiziert mit viel Gartenerde, welche zuvor 3 Minuten lang mit Wasser gekocht war, um allein die Sporenbildner in Kultur zu bekommen, entwickelte sich bei 37^0 schon nach 24 Stunden viel Gas, welches am 2. Kulturtage 25 Proz., am 3. Tage 75 Proz. N_2O enthielt. Beim Mikroskopieren waren nur längere, teilweise zu Clostridien angeschwollene Stäbchen nachweisbar; viele davon enthielten mittelständige Sporen. In viel geringerer Zahl waren Stäbchen mit terminalen Sporen zu finden. Wir konnten nicht daran zweifeln, daß es sich hierbei der Hauptsache nach um den sporenbildenden Denitrifikator Bacillus nitroxus mit seinen Nebenarten handelt, welcher später näher betrachtet werden wird.

Bei einem anderen Versuche wurde frische Erde als Infektionsmaterial in Fleischbouillon mit 5 Proz. NH_4NO_3 gebracht und am 3. Tage nach der Impfung, als die Gasbildung infolge der alkalischen Reaktion sich verzögerte, mit $MgHPO_4$ versetzt, zur Bindung des Ammonkarbonates. Mikroskopisch wurden nur lange, bewegliche Stäbchen gefunden, teilweise schon mit Sporen, Nichtsporenbildner fehlten. Trotzdem das Impfmaterial weder gekocht, noch pasteurisiert war, steht es fest, daß auch in diesem Falle unser B. nitroxus im weiteren Sinne die Hauptrolle spielte.

Aus der ganzen verwendeten Ammonnitratmenge (nämlich 12,5 g hätten sich 1750 ccm Gas, als Stickstoff oder als Stickoxydul berechnet, entwickeln können, weil 1 g NH_4NO_3 140 ccm N_2 erzeugen kann, wenn die NO_3-Gruppe gänzlich spaltet und die NH_4-Gruppe unverändert bleibt.

Im ganzen wurden an Gas aufgefangen 859 ccm, wovon die Zusammensetzung aus folgender Tabelle hervorgeht :

Datum	Gas im ganzen in ccm	N_2O in ccm	N_2O in %	CO_2 in ccm	CO_2 in %	N_2 in ccm	N_2 in %	Frische Erde in Bouillon mit 5% NH_4NO_3 bei 37° C.
15. Juni Beginn .								Beginn der Kultur.
16. „	30	18	60	8	27	4	13	
17. „ Morgen .	161	88,5	55	67,6	42	4,9	3	Mit $MgHPO_4$ in
17. „ Mittag . .	178	46,4	26	124,6	70	7	4	Überschuß versetzt,
18. „	180	75,6	42	100,8	56	3,6	2	weil die Gasbildung
19. „	198	179,2	88	18,8	12	0	0	sich verzögerte und
21. „	88,5	71,7	81	7,1	8	9,7	11	dadurch wieder be-
22. „	24	19,4	81	1,9	8	2,7	11	schleunigt.
Total	859	498,8	58	328,8	383	31,9	3,7	

Aus diesem Versuche sieht man, daß die Denitrifikation durch die Sporenbildner in Rohkultur nur ganz wenig freien Stickstoff, nämlich 3,7 Proz., dagegen sehr viel N_2O, nämlich 58 Proz., erzeugt hat, während das übrige Gas aus Kohlensäure bestand. Stickoxyd war nicht gegenwärtig. Überhaupt haben wir dieses letztere Gas bei keinem der hier beschriebenen Versuche gefunden, wohl deshalb, weil wir nur bei neutraler oder alkalischer Reaktion arbeiteten (vergl. S. 351 drittletztes Alinea).

Wenn man viel weniger Ammonnitrat oder Kaliumnitrat verwendet und eben wie im vorigen Versuche mit viel frischer Erde impft, so vermindert sich das Stickoxydul, während der freie Stickstoff sich vermehrt, wie aus folgendem Versuche hervorgeht. Es wurden am 5. Juni 1909 250 ccm Fleischbouillon mit 2,5 g NH_4NO_3 (also 1 Proz.) in geschlossener Flasche mit frischer Gartenerde geimpft und bei 37° kultiviert; die Gasbildung war wie folgt:

	Gas im ganzen in ccm	N_2O in ccm	NO_2 in %	CO_2 in ccm	CO_2 in %	N_2O in ccm	N_2 in %	Frische Erde in Bouillon mit 1% NH_4NO_3 bei 37°.
7. Juni	200	168	84	14	7	18	9	Der Versuch be-
8. „	64	41	64	20	3	21	33	ginnt 5. Juni.
10. „	22	1	5	0,9	4	20	21	
Total	286	210	73,7	16,9	58%	59	20,5	Hätte 350 ccm Gas als N_2 oder N_2O geben können. Wurde am 7. Juni übergeimpft in dieselbe Nährlösung,
7. Juni, Überimpfung								jedoch mit nur 2 g
8. Juni	99	24,3	25	7,3	7,5	65,5	67,5	NH_4NO_3, welche
9. „	100	22,5	22,5	5	5	72,5	72,5	also 280 ccm Gas als
10. „	33	3,3	10	1	3	28,7	8	N_2 hätte geben könn.
Total	230	50,1	21.8	13,3	5,7	166,7	7,25	

Hieraus sieht man, daß das Gas im Anfang 73,7 Proz. N_2O, nach der Überimpfung nur noch 21,6 Proz. N_2O enthielt, während der Stickstoffgehalt dabei von 20,5 Proz. auf 72,5 Proz. gestiegen war.

Mikroskopiert man diese und ähnliche bei 37° geführte Gärungen, so findet man, daß darin neben vielen Sporenbildnern sehr viele kleine, nicht sporenbildende Bakterien vorkommen, welche letztere bei der Überimpfung stark an Zahl sich vermehren.

Wir glauben aus diesen und ähnlichen Versuchen schließen zu müssen, daß selbst bei der Verwendung von nur 1 Prozent Nitrat in Bouillon bei der Impfung mit viel frischer, nicht pasteurisierter Gartenerde in der Rohkultur zunächst nur B. nitroxus zur Entwicklung gelangt, obschon das Nährmedium für andere denitrifizierende Arten günstiger ist, was, allem Anscheine nach, zu dem bemerkenswerten Resultate führt, daß unsere sporenbildende Nitroxusgruppe die in Gartenerde bei weitem am allgemeinsten verbreiteten Denitrifikatoren umfaßt, weil sie anders sofort, das heißt schon in der Rohkultur, ihren Konkurrenten Platz machen müßten.

Weil man meinen könnte, daß in den vorhergehenden Versuchen die bekannte Spaltung des Ammonnitrats in Stickoxydul und Wasser, welche durch Erhitzung stattfindet, auch durch die Mikroben hervorgerufen werden könnte, erinnere ich zunächst an die schon erwähnte Erfahrung, daß bei allen früher untersuchten Denitrifikationen das Ammon der Nährlösung nach Beendigung der Denitrifikation quantitativ zurückgefunden wird. Für unseren speziellen Fall wünsche ich die Richtigkeit dieser Ansicht noch durch ein paar besondere Beispiele zu erläutern, welche zeigen, daß das Stickoxydul in gleicher Menge aus Kalium- oder Natriumnitrat, wie aus Ammonnitrat entsteht. Als erstes Beispiel nehme ich den Fall von Fleischbouillon mit 1 Proz. KNO_3, infiziert mit frischer Gartenerde bei 37°, wobei anfangs wieder nur Sporenbildner, später auch viele kleine Nichtsporenbildner auftreten. Die Gase hatten folgende Zusammensetzung:

Beginn	Datum	Gas im ganzen in ccm	N_2O in ccm	N_2O in %	CO_2 in ccm	CO_2 in %	N_2 in ccm	N_2 in %	
15. Juni	17. Juni	192	146	76	11,5	6	33,5	18	**Pro g KNO_3 entsteht 112 ccm N_2. Verwendet 2 g KNO_3 kann also 224 ccm ergeben.**
	18. „	54	13	24	—	40	41	76	
Total		246	159	64,6	11,5	4,7	75,5	30,7	

Wie man sieht, ist auch hier das Gas größtenteils Stickoxydul. Daß im ganzen 246 ccm Gas entstanden ist, also 22 ccm mehr, wie überhaupt an Stickstoff (oder Stickoxydul) würde gebildet werden können, muß für die Hälfte auf Kohlensäure zurückgeführt werden. Wasserstoff fehlte gänzlich.

Bei der Aussaat dieser Kultur auf Fleischagar entwickelte sich massenhaft eine der gewöhnlichen Begleitbakterien der denitrifizierenden Arten, während die letzteren selber auf den Platten ohne ganz bestimmtes Anhäufungsverfahren oft nur in geringer Zahl aufkommen. Diese Denitrifikatoren gehörten auch in diesem Falle der Nitroxusgruppe an. Die nicht denitrifizierende Begleitbakterie ergab sich als zur Coligruppe gehörig und als starker Gärungserreger in Glukose-Pepton-

lösung bei 37⁰. Übrigens werde ich auf das Verhalten der Gärungserreger bei der Denitrifikation noch zurückkommen.

Als anderes Beispiel wählen wir einen Versuch mit Bouillon mit 8 Proz. KNO_3, geimpft mit viel frischer Erde und geführt bei 37⁰ C.

Das Gas war wie folgt zusammengesetzt:

Beginn	Datum	Gas im ganzen in ccm	N_2O in ccm	N_2O in %	CO_2 in ccm	CO_2 in %	N_2 in ccm	N_2 in %
19. Juni	21. Juni	160	118,5	74	22,4	14	19	12
	22. „	88	81	92	3,5	4	3,5	6
	24. „	66	58	89	1,3	2	6,6	10
	25. „	21	18,5	88	0,4	2	2	10
	1. Juli	30	25	83	1,6	0,5	4,5	15,4
Total		365	301,0	35,2	29,2	4,5	35,1	10,7

Die so große Menge von N_2O schon von Anfang an muß bei diesem Versuche nicht nur aus dem hohen Salpetergehalt, sondern auch daraus erklärt werden, daß nur ganz allein durch Sporenbildner denitrifiziert wurde. Bezüglich des zuerst gesammelten Gases muß bemerkt werden, daß wenigstens im Anfang relativ viel Kohlensäure gelöst bleiben kann. Mit einem noch höheren Salpetergehalt, nämlich 12 Proz., gelingt der Versuch noch beinahe ebensogut, doch nähert man sich dabei dem Grenzwert. Vergleicht man nun diese Zahlen mit den mit Ammonnitrat erhaltenen, so sieht man aufs neue, daß die Ammongruppe an sich beim Denitrifikationsvorgange nicht in Betracht kommt. Dasselbe gilt bezüglich der Amido- und Aminogruppen, wie sie sich in Pepton, Harnsäure, Ureum und Asparagin finden, doch erscheint es unnötig, dabei länger zu verweilen.

Die Entstehung eines Gasstromes, welcher tagelang dauert, sich konstant auf einem Gehalt an Stickoxydul von 88 Proz. bis 92 Proz. hält, und das durch einen so einfachen Versuch, scheint mir ein bemerkenswertes biologisches Resultat, und man sieht aus dem Vorhergehenden, wie ungerecht es ist, daß in den neueren Arbeiten über Denitrifikation das Stickoxydul überhaupt nicht berücksichtigt wird.

4. Welche waren die Bakterien α und β von Gayon und Dupetit?

Obschon die Beantwortung dieser Frage an und für sich von untergeordneter Bedeutung scheint, kommen wir darauf dennoch kurz zurück, weil die Erwägung derselben zur Aufdeckung eines Fehlers in der übrigens so ausgezeichneten Abhandlung der genannten Autoren veranlaßte, welcher für unseren Zweck notwendigerweise aufgeklärt werden muß.

Wie oben in der Einleitung gesagt, sollen die Mikroben α und β von Gayon und Dupetit sich dadurch von einander unterscheiden, daß α wohl und β nicht imstande ist, Stickoxydul zu erzeugen in einer wie folgt zusammengesetzten Lösung: 1000 g Wasser, 10 g Kaliumnitrat, 7 g Zitronensäure, 5 g Asparagin, 5 g Kaliumphosphat, 5 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Chlorcalcium, Spuren von Aluminiumsulfat, Ferrosulfat und Natriumsilikat, neutralisiert mit Ammon, während sie in ihren Fleischbouillonkaliumnitratlösungen nichts von der Bildung von Stickoxydul bemerkt

haben, weder durch α noch β. Da nach unserer Erfahrung alle denitrifizierenden Bakterien in allen Nährlösungen sowohl Stickstoff wie Stickoxydul, wenn auch in sehr wechselnden Mengen, erzeugen, kann diese Angabe unmöglich richtig sein. Wie kann es denn erklärt werden, daß die Autoren bei ihrem Mikroben β überhaupt kein Stickoxydul fanden, bei ihrem Mikroben α nur dann, wenn in ihrer Ammoncitrat-Nitratlösung noch überdies Asparagin vorkam, und daß sie die Einteilung ihrer Arbeit gründen konnten auf das Fehlen des Oxyduls bei allen Versuchen mit Bouillon?

Um darauf zu antworten, müssen wir die weitere Frage aufwerfen, auf welche Weise Gayon und Dupetit 1886 das Stickoxydul neben dem Stickstoff nachgewiesen haben. Die Autoren sagen nichts über die dabei befolgten Methoden. Doch steht es für uns fest, daß eben darin die Erklärung ihrer Angaben gelegen sein muß. Wir sind nämlich überzeugt, daß sie ihre quantitativen Bestimmungen ausgeführt haben vermittelst des Explosionsverfahrens durch den elektrischen Funken nach der Vermischung des Gases mit Wasserstoff, obschon die Methode der Explosion mit Knallgas schon seit 1877 in Verwendung war[1]). Dagegen dürfte die Verbrennung in der Platinkapillare erst im Jahre 1888 in Gebrauch gekommen sein, wenn auch schon seit 1877 bekannt[2]).

Als wir unsere eigenen Versuche begannen, befolgten wir ebenfalls die Explosionsmethode mit Wasserstoff, und kamen bald zu dem auffallenden Resultat, daß unsere denitrifizierenden Bakterienkulturen Gasgemische erzeugten, worin entweder mehr als 25 Proz. oder gar kein N_2O vorkam. Wir kamen dadurch zur Ansicht, daß bei unserer Versuchseinrichtung ein Gas, welches weniger als 25 Proz. N_2O enthielt, nach dem Vermischen mit dem gleichen Volum Wasserstoff nicht mehr explodieren konnte. Es stellte sich heraus, daß diese Ansicht der Hauptsache nach richtig ist; zwar konnten mit größeren Funken noch etwas geringere Mengen N_2O wie 25 Proz. des gesamten Gases zur Explosion gebracht werden, doch lag die Grenze nicht weit von dieser Zahl. Das war denn auch die Ursache, daß alle unsere späteren Versuche mit der Platinkapillare stattfanden, und Gayon und Dupetit, welche aller Wahrscheinlichkeit nach nur die Wasserstoffmethode befolgten, haben offenbar nicht bemerkt, daß dieselbe bei der Gegenwart von weniger als 25 Proz. N_2O nicht mehr zu verwenden ist.

Durchblicken wir nämlich ihre Zahlen, so ergibt sich, daß diese Forscher in den 8 von ihnen gegebenen Gasanalysen, wobei N_2O gefunden wurde, die folgenden Prozentzahlen an diesem Gase fanden: 49 Proz., 40,96 Proz., 41,09 Proz., 16,55 Proz., 75,75 Proz., 47,68 Proz., 31,83 Proz., 23,23 Proz. Hiervon scheint nur die Zahl 16,55 Proz. auf den ersten Blick unserer Hypothese zu widersprechen. Aber dieses nur scheinbar, denn es wurden neben dieser Quantität Stickoxydul 23,10 Proz. Kohlensäure und 60,35 Proz. Stickstoff gefunden. Weil nun der Wasserstoff erst dann mit dem Gase gemischt wird, wenn die Kohlensäure entfernt ist, muß man das Stickoxydul nicht in Prozenten auf das Gesamtgas berechnen,

---

[1]) Bunsen, Gasometrische Methoden. 1877. Hempel, Berichte der d. Chem. Gesellschaft. 1882, p. 903.

[2]) Orsat, Note sur l'analyse industrielle des Gas. Paris 1877. Drehschmidt, Berichte der d. Chem. Gesellsch. Bd. 23. 1888. pag. 3295.

sondern in Prozenten auf dasselbe nach Abzug der 23,10 Proz. Kohlensäure, so daß, wenn auf 76,9 ccm Gas 60,35 cmm N_2 und 16,55 ccm N_2O gefunden werden, das dann doch jedenfalls auf 21,5 Proz. N_2O auskommt, offenbar die untere Grenze, welche die Autoren noch auffinden konnten, und sehr nahe gelegen bei unserer Minimumzahl von ca. 25 Proz. Alle Quantitäten weniger wie 21,5 Proz. N_2O sind Gayon und Dupetit also entgangen, wodurch sie zu dem Schlusse kamen, daß ihr Mikrobe β überhaupt kein N_2O erzeugt, und ihr Mikrobe α, dieses Gas nur dann liefert, wenn kultiviert in ihrer Ammoncitratlösung bei Gegenwart von Asparagin.

Diese Behauptungen sind folglich beide unrichtig und müssen derweise korrigiert werden, daß bei allen ihren Versuchen α und β beide, eben wie bei uns, unzweifelhaft stets Stickoxydul gebildet haben, doch daß sie dieses Gas erst nachweisen konnten, sobald dessen Gehalt 16,5 Proz. des Gesamtgases oder 21,5 Proz. des Gases nach Abzug der Kohlensäure betrug. Weil nun bei keinem ihrer Versuche durch Mikroben β 16,5 Proz. N_2O gebildet würden, sondern immer weniger, so mußten sie glauben, daß derselbe überhaupt kein N_2O erzeugte, und weil ihr Mikrobe α nur bei Gegenwart von Asparagin in ihrer Ammoncitrat-Nitratlösung mehr als 16,5 Proz. N_2O erzeugte, meinten sie, daß dadurch ohne Asparagin überhaupt kein Stickoxydul entsteht.

Fragen wir uns nun schließlich, mit welchen der gegenwärtig bekannten denitrifizierenden Arten die Mikroben α und β von Gayon und Dupetit zusammenfallen, so betrachten wir es als wahrscheinlich, daß α nur Bacillus pyocyaneus, β nur Bacillus Stutzery (= B. nitrogenes) gewesen sein kann; doch erscheint die Sache nicht wichtig genug, um die dafür aus den Details ihrer Untersuchung abzuleitenden Gründe hier ausführlich zu besprechen, um so mehr, weil es feststeht, daß ihre Kulturen nicht rein waren.

Anhangsweise wünsche ich bei dieser Gelegenheit noch hervorzuheben, daß die vielfach zitierten, aber ganz ungenügenden Versuche von Giltay und Aberson mit einer die Kulturgelatine verflüssigenden Art ausgeführt wurden, welche, wie aus einigen incidentellen Bemerkungen in ihrer Abhandlung abzuleiten ist, wohl Bacillus pyocyaneus gewesen sein kann, was jedoch bei ihren unzureichenden Angaben durchaus zweifelhaft bleiben muß. Daß diese Autoren kein Stickoxydul gefunden haben, welches bei ihren Versuchen doch sicher gebildet ist, ist daraus zu erklären, daß sie zum Nachweise dieses Gases die Löslichkeit desselben in Alkohol in Anwendung zu bringen versuchten, also wohl die schlechteste Methode, die überhaupt gewählt werden konnte. Das einzige, was sie bezüglich des Stickoxyduls (und des Wasserstoffs) sagen, lautet wörtlich: [1]) »De l'absence d'hydrogène nous nous sommes assurés en faisant jaillir dans le gaz, préalablement mêlé d'oxygène, des étincelles électriques. L'absence d'hémioxyde d'azote fut constatée, dans quelques analyses, en abandonnant le gaz dégagé, après absorption de l'acide carbonique par la potasse solide, au dessus de l'alcool, dans lequel le gaz hilarant se dissout facilement«. Daraus kann der Leser jedoch unmöglich eine Überzeugung erhalten.

---

[1]) Sur un mode de dénitrification. (Archives Néerlandaises. T. 25. 1892. p. 356.)

5. Bacillus sphaerosporus und Bacillus nitroxus.

Bei unseren oben beschriebenen Versuchen mit Nitratbouillon haben wir gesehen, daß in allen Rohkulturen bei weitem die größte, in vielen Fällen wohl die gesamte Menge des Stickoxyduls durch Sporenbildner hervorgebracht wird. Es soll auf diese letzteren nun näher eingegangen werden.

Sporenbildende in den Reinkulturen schwach denitrifizierende Arten sind schon seit langer Zeit bekannt, und, wenn auch unkenntlich, in der Literatur verzeichnet. Als ich noch meinte, daß dadurch allein Stickstoff erzeugt wurde, konnten dieselben nur als weitere Beispiele der langen Reihe denitrifizierender Arten angesehen werden. Seitdem sich jedoch ergab, daß eben die Sporenbildner so außerordentlich geeignet sind, Versuche bezüglich der Stickoxydulbildung anzustellen, erregen sie ein viel höheres Interesse. Es mögen deshalb die Bedingungen ihres Vorkommens und die Methoden zur Erhaltung derselben, sowie ihre weiteren Eigenschaften näher besprochen werden.

Obschon bei den Denitrifikationsversuchen im allgemeinen, wobei Sporenbildner die Erreger sind, eine kleine Anzahl verschiedener »guter« Arten in Betracht kommen dürfte, handelt es sich bei Nitratbouillon wohl nur um eine einzige umfangreiche »Sammelart«, eine Formengruppe zahlreicher Typen, wovon wir an dieser Stelle zwei mit besonderen Artnamen belegen wollen, und welche nicht richtig aufgefaßt werden können, wenn man die Denitrifikationsvorgänge allein als Grundlage für elektive Kultur verwendet. Um die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den sehr abweichenden, hier zur Beobachtung kommenden Unterarten und Varietäten zu verstehen, ist es nötig, erstens auch die Eiweißfäulnis als Ausgangspunkt für die Kultur zu wählen und mit einiger Beharrlichkeit die daraus zu isolierenden Aëroben auf ihr Denitrifikationsvermögen zu untersuchen, und zweitens, die zugleich an Acetate und an hohe Temperaturen adaptierten Formen in betracht zu ziehen.

Für das Erste wird in Wasser gelöstes und suspendiertes Eiweiß mit Gartenerde infiziert, zum Sieden gebracht, eine Stöpselflasche mit dieser Flüssigkeit gefüllt, oder auch ein offener Kolben und bei 30—37° gebrütet. Nach ein paar Tagen beginnt die stinkende Fäulnis mit denselben Erscheinungen, wie ohne vorheriges Kochen, aber natürlich auch ohne die nicht sporenerzeugenden Arten, welche also für den Hauptvorgang gleichgiltig sind[1]). Die eigentliche Fäulnis wird also allein durch die sporenbildenden Anaëroben hervorgerufen, daneben finden sich aber sehr bemerkenswerte, oft rundsporige Aëroben, wovon wir eine besonders allgemeine und morphologisch interessante unter dem Namen **Bacillus phaerosporus**, gleich betrachten werden. Auch die Anaëroben selbst sind zum Teil ebenfalls rundsporige Formen und unzweifelhaft nahe verwandt mit B. sphaerosporus, indem es feststeht, daß die ersteren dann und wann, bei noch unbekannten Bedingungen die rundsporige aërobe Varietät abwerfen, welche nicht wieder in den anaëroben Zustand zurückzuführen ist und sich vergleichen läßt mit den

---

[1]) Die von Hauser als Fäulnisbakterien beschriebenen Proteusarten können überhaupt nicht als eigentliche Fäulniserreger betrachtet werden, weil es nur Halbanaëroben sind (wie Coli) und weil sie die eigentlichen widerlichen Fäulnisprodukte (Skatol und Merkaptan) nicht erzeugen.

asporogenen Sektorvarianten anderer Bakterien, worüber wir noch sprechen werden bei B. nitroxus. Natürlich ist es nicht leicht, diese versteckte Form der Variabilität zu erkennen, und bei der Seltenheit der Erscheinung denkt der Anfänger leicht an Infektion.

Jedoch gibt es keine Schwierigkeit, die hier in betracht kommenden Aëroben aus den Rohanhäufungen zu isolieren, weil sie erblich konstant sind und von Anfang an reichlich in der Eiweißfäulnis vorkommen, wozu sie, wie gesagt, selbst keine Veranlassung geben, weil sie bei der Abwesenheit von Nitraten und Kohlehydraten, die Eiweißkörper nur aërob spalten.

Diese Gruppe aërober Fäulnisbewohner enthält mehrere denitrifizierende Formen. Die in kultureller und morphologischer Beziehung am meisten auffallende darunter ist ein typisch rundsporiges Stäbchen oder Clostridium (Tafelfig. 1), durch viele Übergangsformen verbunden mit stäbchen- und clostridienartigen Varietäten, welche längliche oder überhaupt keine Sporen erzeugen. Die Art gehört zu den allgemein verbreiteten Erdbakterien, und die Schwierigkeit ihrer richtigen Erkenntnis (in der Literatur konnte ich keine darauf gänzlich passende Beschreibung finden, die rundsporige als B. fusisporius bezeichnete Form gehört wohl nicht hierher)[1]) liegt in dem außerordentlichen Formenreichtum, wodurch man sozusagen bei jedem Versuche etwas anderes zu finden meint, — da eine nicht, da eine wohl verflüssigende Varietät; ein Stäbchen oder ein Clostridium; stark beweglich oder unbeweglich; eine Form mit länglichen oder eine mit runden Sporen; verflüssigende Kolonien, welche Ausläufer in die Kulturgelatine aussenden oder nicht; welche hell oder trüb, gelb oder ganz ungefärbt ercheinen; welche nur durch homogene Kolonien repräsentiert werden, oder in deren Kolonien Bakterien von sehr verschiedener Größe vorkommen, von Stäbchen von 3 μ Dicke herab bis zu ganz kurzen mikrokokkenartigen Stäbchen von 0,2 bis 0,3 μ Dicke, kurz, ein wahres Formenchaos. Alle diese Varietäten zeigen, wie das meistens der Fall ist bei polymorphen Arten, eine große Konstanz, jedoch ist in den älteren Kulturen auch starke Variabilität zu beobachten, so besonders im Vermögen, Sporen zu erzeugen, welches Vermögen leicht verloren geht, was ebenfalls für die Beweglichkeit gilt.

Aus Gartenerde kann man die wenig oder nicht beweglichen Varietäten dieser Art noch auf eine ganz andere Weise anhäufen, wie durch das Fäulnisverfahren, nämlich dadurch, daß man die Erde impft in eine Flüssigkeit von folgender Zusammensetzung: 100 Leitungswasser, 0,5 Natriumacetat oder Calciumacetat, 0,02 Dikaliumphosphat, und bei 40^{0} C kultiviert. Nach ein paar Tagen wird eine Aussaat gemacht auf Bouillongelatine bei 22^{0} C, wobei dann eine Menge langsam wachsender, durchsichtiger, nicht oder sehr schwach verflüssigender, zu mehreren Varietäten gehörender Kolonien entsteht (Bacillus sphaerosporus calcoaceticus), welche in sehr verschiedenem Maße zur Sporenbildung befähigt sind, runde oder längliche Sporen erzeugen, mehr oder weniger beweglich sind, schnell oder langsam wachsen, wenig oder nicht verflüssigen, kurz die gleiche Veränder-

[1]) Möglicherweise hat Winkler sie vor sich gehabt, als er die Beschreibung im Bakteriol. Centralbl. Abt. II. Bd. 1. 1895. p. 609 aufstellte, und Duclaux, als er seine Gattung Tyrothrix aus Käse isolierte.

lichkeit besitzen, wie ihre Verwandten aus der Eiweißfäulnis. Versucht man die Kultur überzuimpfen unter gleichen Bedingungen, wobei sie erhalten wurde, so bekommt man kein oder nur sehr dürftiges Wachstum. Einige, allerdings nur gelegentliche Versuche, um unter diesen Formen Denitrifikatoren zu finden, gaben kein sicheres Resultat.

Fragt man sich, mit welcher beschriebenen Bakterienspezies die verschiedenen hier betrachteten Formen am nächsten verwandt sind, so muß wohl geantwortet werden, mit B. subtilis; doch ist auch diese eine schwierige »Sammelart«, welche in einem Bakteriengemisch nur sicher kenntlich ist, wenn durch ein gutes Anhäufungsverfahren (in diesem Falle z. B. der Versuch mit lebenden Kartoffelscheiben bei 37° C) die nötige Einschränkung in der übrigen Bakterienwelt gebracht ist.



Figur 2. Anaërobe Eprouvetten-kultur mit treibender, hohler Glaskugel.

Von den nächstverwandten Anaëroben können Tetanus und B. acidi urici[1]) genannt werden, während die Namen B. septicus und B. putrificus coli wohl hierher gehörige Formen bedeuten, jedoch noch allzu unsichere Sammelbegriffe sind, um als Vergleichsobjekte größere Klarheit zu bringen.

Außerordentlich charakteristisch und nach meiner Meinung auf Grund seiner allgemeinen Verbreitung wohl als die Hauptform der angeführten Bakteriengruppe zu betrachten, ist der im Photogramm 1 dargestellte interessante rundsporige Stamm von B. sphaerosporus. Als typischer Bewohner des Stallmistes und leicht aus Erde im allgemeinen, besonders aus trockenem Staub von gedüngten Feldern zu erhalten, ist derselbe doch am sichersten zu finden in den nach oben gegebener Vorschrift angefertigten Präparaten der Eiweißfäulnis. Auf Fleischgelatine erkennt man ihn an den langsam verflüssigenden und doch schließlich sehr groß werdenden gelblichen Kolonien, welche oft am Rande korkzieherförmig in die Gelatine bohrende Ausläufer erzeugen. Die gelbe Farbe rührt von den Bakterienkörpern selbst her. Das mikroskopische Bild ist schön; Stäbchen, gewöhnlich an einem Ende verdickt, mit endständiger Kugelspore im dicken Teile. Echte Clostridien sind seltener. Die Stäbchen sind beweglich und tragen peritriche Cilien. Die Länge ist variabel, 2—5 μ; die Dicke ebenfalls, und wechselt zwischen 0,7—1,5 μ; die Sporen messen 1 μ.

Kohlehydrate werden nur langsam angegriffen und veranlassen die Ablagerung einer reichlichen Glykogenmenge, welche sich mit Jod tief violett braun färbt; organische Salze werden zu Carbonat oxydiert; alles genau so wie bei B. nitroxus, worüber später; die Hauptnahrung besteht jedoch für beide Arten aus Eiweißkörpern. Ureum wird nicht gespalten. Gärungserscheinungen fehlen entweder ganz, oder werden in schwachem Grade beobachtet in Lösungen von 2 Proz. Glukose und 2 Proz. Pepton bei Luftabschluß bei 37° C. Für diese Kultur ist die Kugelröhre Fig. 2 zu empfehlen, worin der nicht vollständige Luftabschluß durch eine

[1]) Liebert, in Kon. Akademie van Wetenschappen te Amsterdam, 6. Mei 1909 p. 990.

treibende hohle Glaskugel erreicht wird, deren Diameter nur wenig geringer ist wie derjenige der Röhre selbst. Unter den Gärprodukten wurden Kohlensäure und Wasserstoff erkannt, was auch wieder für B. nitroxus gilt.

Nur die frisch isolierten Kulturen zeigen in Fleischbouillon bei Luftabschluß mit 0,1 Proz. KNO_3 bei 30^0 à 37^0 eine deutliche Denitrifikation. Überimpfungen und lange aufbewahrte Kulturen denitrifizieren nicht mehr. Alles dieses gilt ebenfalls für gewisse Varietäten von P. nitroxus, welcher zu B. sphaerosporus in engster Beziehung steht.

Doch gehen wir nun über zu unserem Hauptthema, nämlich zu den Bakterien aus den Denitrifikationen, welche der Hauptsache nach oder ausschließlich nur durch den soeben genannten Sporenbildner verursacht werden. Als Ausgangspunkt wählen wir eine Anhäufung, wo nur allein Sporenbildner gegenwärtig sein können.

Eine solche wird dadurch erhalten, daß entweder gekochtes oder scharf pasteuriertes Impfmaterial, oder, wie früher schon hervorgehoben, eine sehr hohe Nitratkonzentration in Bouillon verwendet wird, in welch letzterem Falle frische Erde für die Infektion, und zwar immer in beträchtlicher Menge zu nehmen ist, und wobei die Nichtsporenbildner eben durch das Nitrat in ihrer Entwicklung zurückgehalten werden. Dies ist jedoch nicht spezifisch für die Nitrate, sondern kann auch durch andere Salze in konzentrierter Lösung herbeigeführt werden.

Es muß aber noch einmal hervorgehoben werden, daß die denitrifizierenden Sporenbildner so allgemein in Gartenerde verbreitet sind, daß sie in Nitratbouillon mit Nitratgehalten zwischen 1 Proz. bis 12 Proz. bei 20^0 bis 37^0 C, wenn viel Gartenerde als Impfmaterial verwendet wird, in der Rohkultur in der Weise alle anderen Bakterien verdrängen, daß man mikroskopisch kaum von den letzteren etwas bemerkt, und nur Stäbchen mit und ohne Sporen von Denitrifikatoren erblickt. Zwar zeigt das Plattenverfahren dabei oft das umgekehrte Verhalten, doch liegt das daran, daß auf den gewöhnlichen Kulturplatten die denitrifizierenden Sporenbildner schwierig, die anderen Arten leichter wachsen. Daß mithin geschlossen werden muß auf die große Allgemeinheit der Sporenbildner in den Bodenproben, folgt übrigens auch erstens daraus, daß man auf Erbsenlaub-Dekokt-Agar bei 30^0 C aus der genannten Rohkultur tatsächlich die Kolonien der Sporenbildner bei weitem allgemeiner findet wie diejenigen der übrigen Arten, so daß tatsächlich die in den gewöhnlichen Bouillonplatten gegebenen Ernährungsbedingungen verbessert werden, wenn dafür die genannte Pflanzensubstanz angewendet wird. Zweitens muß jener Schluß gezogen werden aus dem Umstande, daß die Überimpfungen der bezeichneten gärenden Kulturflüssigkeiten, wenigstens bei niedrigen Nitratgehalten, selbst bei 37^0 C, sich mehr und mehr anreichern mit den nicht sporenerzeugenden Arten, worunter B. pyocyaneus wieder eine Hauptrolle spielt. Hieraus ergibt sich nämlich offenbar, daß die Lebensbedingungen auch in den Rohkulturen für diese Arten ganz gute gewesen sein müssen und nur ihre geringe Anzahl ihren, im Boden viel allgemeiner verbreiteten Sporenbildner-Konkurrenten Überlegenheit verlieh. Und dieses sieht man auch wieder aus dem Gehalte der Gärungsgase an N_2O, welcher Gehalt in den Rohkulturen, in Bouillon mit 1 Proz. KNO_3 oder 2 Proz. NH_4NO_3 von 76 Proz. bis 84 Proz. betragen kann, und schon bei der ersten Überimpfung auf 20 Proz. bis 25 Proz.

zurücksinkt, ganz in Übereinstimmung mit der Verschiedenheit der Stickoxydulbildung zwischen Sporen- und Nichtsporenbildnern.

Findet dagegen diese Überimpfung statt aus einer Rohkultur mit 8 Proz. à 12 Proz. Nitrat in eine solche, welche ebenfalls 8 Proz. à 12 Proz. Nitrat enthält, wodurch die vorwiegende Entwicklung der Sporenbildner bleibend gesichert ist, so sieht man schon nach 24 Stunden die Gasentwicklung beginnen; am zweiten Tage wird eine heftige Schaumgärung beobachtet und das Gas enthält 80 Proz. oder mehr Stickoxydul, so daß ein glühender Span plötzlich darin entflammt, und die nicht sporenerregenden Denitrifikatoren offenbar in ihrer Entwicklung zurückgehalten werden.

Auch das mikroskopische Bild zeigt der Hauptsache nach in diesem Falle nur Sporenbildner allein.

Wir müssen hier jedoch noch hinzufügen, daß hohe Nitratgehalte in den Nährflüssigkeiten nahezu allen Denitrifikatoren für die Stickoxydulbildung günstiger sind, wie geringe, wovon bei den Reinkulturen Beispiele gegeben werden, so daß auch die Nichtsporenbildner unter diesen Bedingungen mehr Oxydul erzeugen würden, wenn sie nicht von den Sporenbildnern verdrängt wären.

Es gelang uns leicht durch das Plattenverfahren, aus den Rohkulturen drei, bezüglich Wachstum und Form abweichende, sporenbildende Denitrifikatoren zu isolieren. Dafür wird am besten Erbsenlaubdekoktagar verwendet[1]), worauf diese Formen besonders kräftig fortkommen. Zwei davon sind Stäbchenbakterien, die dritte ist bei normaler Ausbildung ein kurzes Clostridium. Trotz der morphologischen Verschiedenheit muß es sich wohl um eine einzige Spezies handeln, nicht nur weil die Lebensbedingungen der drei Formen identisch sind, sondern auch weil die physiologischen Eigenschaften bezüglich Ernährung und Denitrifikation übereinstimmen. Diese Art ist dann die mit dem Namen *Bacillus nitroxus* bezeichnete. Weil die Clostridiumform auf den Platten bei weitem die allgemeinste ist, soll diese hier mehr im besonderen betrachtet werden.

Die Kolonien auf Erbsenlaubagarplatten sind bei 30^0 dicke, flach ausgebreitete, gelbliche, weiche, glänzend-feuchte Massen mit scharfem Rande, von 4 bis 10 mm Mittellinie, anfangs aus clostridienartigen Stäbchen zusammengesetzt (Tafelfig. 3 und 4). Auf Fleischbouillongelatine, bei Zimmertemperatur, bleiben dieselben ziemlich klein, doch wachsen sie auf diesem Substrate auffallend lange fort, verflüssigen etwas und senden nicht selten Ausläufer in das Nährsubstrat, gerade wie B. sphaerosporus. Obschon der Hauptsache nach im erwachsenen Zustande aus kurzen Clostridien (Tafelfig. 5 und 6) bestehend, finden sich in den meisten Kolonien auch neben diesen viele gewöhnliche Stäbchen von verschiedener Länge und Dicke und ohne Sporen, wovon die kleinsten so sehr von der Hauptform abweichen, daß man anfangs kaum glauben kann, daß es sich dabei um eine Infektion handelt. Überdies fehlen die kleinen Stäbchen in einzelnen Kolonien gänzlich, welche dann allein aus Clostridien bestehen, was noch mehr den Gedanken an eine Infektion erweckt.

Auf Bouillonagar, worauf die Kolonien ziemlich klein, z. 1—3 mm in Mittel-

---

[1]) Dargestellt durch 20 g junges, kräftig wachsendes Erbsenlaub, einige Stunden lang mit 100 g destilliertem Wasser zu kochen und zu digerieren.

linie, bleiben und zwischen den Symbionten schwierig aufzufinden sind, wurden diese feinen Stäbchen überhaupt nicht gefunden. Auf diesem Kulturboden sind aber die Glieder, welche bei der Teilung in den jungen Kolonien entstehen, in anderer Beziehung nicht weniger polymorph, so daß man in derselben Kolonie Fäden, Stäbchen von verschiedenster Länge, Kugeln, Zellen, welche durchaus an Apiculatushefe erinnern, birnenförmige und sonderbar gekrümmte und gewundene Konglomerate in bunter Vereinigung nebeneinander findet (Tafelfig. 2).

Auf Erbsenlaubagar erzeugen die Clostridien sehr leicht Sporen. Diese sind dann bohnenförmig und messen 1 bis 2 μ. Sie geben den Clostridien ein ungemein eigentümliches Aussehen, wodurch Ähnlichkeit mit Granulobacter sphaericum entsteht. Jedoch zeigt das in den Clostridien reichlich abgesetzte, sich mit Jod braun färbende Glycogen, daß es sich hier um einen anderen Reservestoff handelt, wie die bei Granulobacter abgelagerte Granulose.

Bei weniger günstiger Ernährung, z. B. in Glukose-Peptonlösung, oder in Bouillon mit oder ohne Nitrat, erzeugt B. nitroxus schwieriger Clostridien, welche wieder höchst veränderlich der Form nach sind. Aber auch die darin vorherrschende Stäbchenform zeigt neben vielen normalen eine Reihe abweichender Gestalten. Entstehen darin Sporen, so sind diese sehr oft vollständig kugelig und viel kleiner wie die bohnenförmigen. Man sieht, daß man hier wieder vor einem Falle ähnlicher Vielgestaltigkeit steht, wie bei dem aus der Eiweißfäulnis isolierten Denitrifikator. Bei dem letzteren äußert die Vielgestaltigkeit sich aber durch den Vergleich verschiedener, jedoch unzweifelbar verwandter Formen unter identischen Ernährungsbedingungen, bei B. nitroxus dagegen durch den Vergleich der Formen von ein und derselben Varietät bei verschiedener Ernährung.

B. nitroxus zeigt aber auch sehr leicht eine Variabilitätserscheinung mit erblich konstantem Erfolge. Betrachtet man nämlich die Kolonien, welche ein paar Wochen auf Erbsenlaubagar gewachsen sind, genau, so wird man finden, daß in einzelnen davon eine Sektorvariation stattgefunden hat, welche darin besteht, daß ein sektorförmiger Teil der Kolonie keine Sporen erzeugt hat. Wird davon eine weitere Aussaat gemacht, so ergeben die daraus hervorgehenden Kolonien sich als asporogen, und das Vermögen der Sporenbildung erscheint vollständig verloren, auch bei weiteren Überimpfungen unter günstigen Ernährungsbedingungen.

Die Denitrifikation in Fleischbouillon mit 0,1 à 1 Proz. Kaliumnitrat findet weit besser statt bei Luftabschluß, z. B. bei der Kultur in der Kugelröhre (Fig. 2), wie bei Luftzutritt, und bei lange fortgesetzter Kultur an der Luft können die Überimpfungen dieses Vermögen ebenso vollständig verlieren wie B. sphaerosporus. Dieses erweckt den Gedanken, daß in den Rohdenitrifikationen auch gänzlich anaërobe Stämme von B. nitroxus vorkommen, eine Frage, worüber wohl bald mehr Licht aufgehen wird, da es feststeht, daß, wie schon gesagt, auch zu B. sphaerosporus anaërobe Nebenformen gehören, welche unter den Bedingungen der Eiweißfäulnis leben; doch sind unsere Untersuchungen darüber noch nicht abgeschlossen. Merkwürdigerweise konnte in Erbsenlaubextrakt mit Nitraten wohl Wachstum, jedoch keine deutliche Gasbildung beobachtet werden, eine ebenfalls noch nicht genügend durchstudierte Eigenschaft.

Zufügung von Asparagin, 2% Glukose oder Glycerin zu Nitratbouillon ist dem Denitrifikationsvorgang nicht ungünstig, und auch verdünnte Malzwürze mit Nitrat ist leicht zu denitrifizieren. Ohne peptonartige Stickstoffquelle findet in den Reinkulturen von Nitroxus keine Denitrifikation statt, wohl jedoch in den Rohkulturen, so besonders kräftig in Seignettesalz-Asparagin-Nitratlösung bei 37° C.

Gewöhnliche Gärungserscheinungen in bezug auf die Kohlehydrate können am besten in der Kugelröhre Fig. 2, also wieder bei partiellem Luftabschluß, beobachtet werden. Dieselben sind bei B. nitroxus schwach und nicht bei jeder Kolonie ist die Eigenschaft gleich stark ausgebildet. Auch hier war wieder eine Lösung von 2 bis 5 Proz. Glukose mit 2 Proz. Pepton das Medium, worin die Gärung am deutlichsten stattfand.

Daß manches von dem in diesem § berührten Gegenstande an Unbestimmtheit leidet, mag dadurch entschuldigt werden, daß es sich hier um die Bakterien der Eiweißfäulnis und ihre Verwandten handelt, worin die Beschreibung um so schwieriger wird, je besser man mit deren Formenreichtum bekannt ist.

6. Erzeugung von Stickoxydul in den Reinkulturen der Nichtsporenbildner.

Die Überzeugung, daß alle Denitrifikatoren unter gewissen Umständen, besonders bei hoher Nitratkonzentration und hoher Temperatur, Stickoxydul hervorbringen, hat sich durch die Untersuchung der Reinkulturen dreier gänzlich verschiedener Arten, nämlich Bacillus pyocyaneus, B. Stutzeri und Micrococcus denitrificans gut bestätigt. Von einigen solcher Versuche folgt hier eine Beschreibung:

a) Stickoxydulbildung durch B. pyocyaneus.

Am 29. Juni wurden 150 ccm Fleischbouillon mit 1 Proz. Ammonnitrat, welches sich im Kulturapparat (Fig. 1) bei Luftabschluß befand, infiziert mit einem aus Gartenerde isolierten Stamm von B. pyocyaneus und bei 37° C kultiviert. Die Analyse des über Quecksilber gesammelten Gases gab folgendes Resultat:

Beginn	Datum	Gas in ccm	Stickoxydul in ccm	Stickoxydul in %	Kohlensäure in ccm	Kohlensäure in %	Stickstoff in ccm	Stickstoff in %
29. Juni	1. Juli	43	28	65	3	7	12	28
	6. „	60	43,2	72	6	10	10,8	18
	10. „	90	50,4	56	9	10	30,6	34
	15. „	48	20	44,7	6	12,5	22	54
Total		241	141,6	58,3	24	9,9	75,4	31,8

Bei mikroskopischer und kultureller Plattenuntersuchung stellte sich heraus, daß das Präparat sicher rein geblieben war.

Wie man sieht, war besonders im Anfang viel Stickoxydul im Gase gegenwärtig, so daß am 6. Juli ein glühender Span darin aufflammen konnte. Da sich die relative Oxydulmenge später verminderte, kann damit zusammenhängen, daß

nur 1 Proz. Nitrat verwendet war, welcher Gehalt natürlich schnell zu einer sehr geringen Menge sinken mußte, was ausnahmslos auch in anderen Fällen und in den verschiedensten Rohkulturen mit starker Verminderung des Oxydulgehaltes einhergeht. Am 15. Juli war Nitrat oder Nitrit durch die Diphenylaminschwefelsäurereaktion noch nachweisbar.

b) Stickoxydulbildung durch B. Stutzeri.

Wir haben mit zwei Varietäten dieser Bakterie experimentiert, wovon die eine (Var. Nr. 1) stammte aus einem Denitrifikationsversuch mit Seignettesalz, infiziert mit Gartenerde, die zweite (Var. Nr. 2) aus Fleischbouillon mit 1 Proz. Ammonnitrat, ebenfalls mit Gartenerde in Denitrifikation versetzt. Beide Varietäten bilden deutlich verschiedene Kolonien.

1. Versuch. Am 8. Juli wurde Bouillon mit 1 Proz. Ammonnitrat in geschlossener Flasche infiziert mit Stutzeri (Var. Nr. 1) und kultiviert bei 37°.

Das Gas wurde oberhalb gesättigter Chlorcalciumlösung gesammelt, wovon wir wissen, daß es die Gärungsgase so gut wie gar nicht löst. Die Analyse lehrte folgendes:

Beginn	Datum	Gasvolum in ccm	Stickoxydul		Kohlensäure		Stickstoff		
			in ccm	in %	in ccm	in %	in ccm	in %	
8. Juli	9. Juli	32	3	9,4	4	12,5	25	78,1	Am 15. Juli wurde der Versuch beendet, die Gasbildung dauerte jedoch fort.
	12. „	43	4	9,3	6	14	33	76,7	
	15. „	23	2	9	8	13	18	78	

Mikroskopisch und kulturell konnte nachgewiesen werden, daß die eingeimpfte Bakterie vorherrschte, doch war eine nicht denitrifizierende Infektion eingeschlichen. Der langsame Verlauf des Versuches muß wahrscheinlich auf zu hoher Temperatur und ungenügender Lüftung beruht haben.

2. Versuch. Bouillon mit 1 Proz. Ammonnitrat wurde am 8. Juli mit B. Stutzeri Nr. 2 infiziert. Bei 31° C waren erst am 17. Juli 36 ccm Gas entwickelt, wovon 4 ccm oder 4 Proz. Stickoxydul und 32 ccm oder 89 Proz. Stickstoff, während die Kohlensäure noch gänzlich gelöst war. Das Gas war über Quecksilber aufgefangen.

3. Versuch. Wie vorgehend, jedoch mit 2 Proz. Ammonnitrat.

Die Gasanalyse ergab:

Beginn	Datum	Gesamtgas in ccm	Stickoxydul		Kohlensäure		Stickstoff	
			in ccm	in %	in ccm	in %	in ccm	in %
8. Juli	9. Juli	22	4,5	20,5	2	9	15,5	70,5
		41	6	14,6	6	14,6	29	70,8
		37	3	8,1	4	10,8	30	81,1

Das Gas war oberhalb gesättigter Chlorcalciumlösung gesammelt, und die Untersuchung zeigte, daß die Kultur rein geblieben war.

4. Versuch, wie vorstehend, aber mit 5 Proz. Ammonnitrat.

Beginn	Datum	Gesamtgas in ccm	Stickoxydul in ccm	Stickoxydul in %	Kohlensäure in ccm	Kohlensäure in %	Stickstoff in ccm	Stickstoff in %
10. Juli	12. Juli	31	3	9,7	4	13	24	77
	15. „	24	5	21	12	50	2	29

Am 12. Juli war $MgHPO_4$ zugesetzt, um das Ammoniumcarbonat zu entfernen, wodurch viel Kohlensäure freigestellt war.

Alle diese Versuche zeigen, daß die Kulturbedingungen nicht günstig waren, wie das aber mit Reinkulturen von denitrifizierenden Bakterien in Fleischbouillon so oft eintritt, ohne daß die Gründe dafür immer klar werden. Bekanntlich kann B. Stutzeri sich in Lösungen von organischen Salzen bei Temperaturen zwischen 30 und 33° C viel kräftiger entwickeln, doch war es uns zunächst allein darum zu tun, zu zeigen, daß auch diese Bakterie Stickoxydul erzeugt bei der gewöhnlichen, für Denitrifikation gewählten Versuchsanstellung.

c) Stickoxydulbildung durch Micrococcus denitrificans.

Daß auch der neue, von uns bei Versuchen mit Seignettesalz aufgefundene denitrifizierende Micrococcus in Reinkultur Stickoxydul erzeugen kann, geht aus folgender Beobachtung hervor:

Am 1. Juli wurde Fleischbouillon mit 1 Proz. Ammonnitrat in dem Quecksilberapparat mit Reinkultur des Micrococcus infiziert und bei 37° kultiviert. Das Wachstum war langsam, und die Gasanalyse lehrte folgendes:

Beginn	Datum	Gasvolum in ccm	Stickoxydul in ccm	Stickoxydul in %	Kohlensäure in ccm	Kohlensäure in %	Stickstoff in ccm	Stickstoff in %
1. Juli	10. Juli	50	10	20	19	38	21	42
	15. „	22	5	23	5	23	12	54

Ein fünfter Teil des Gases war also Stickoxydul.

Der Versuch wurde nicht weiter verfolgt, weil es uns auch hier nur um das qualitative Resultat zu tun war.

Aus unseren eigenen Versuchen mit Bouillon-Nitrat, Asparagin-Nitrat und Seignettesalz-Nitrat in Verbindung mit denjenigen von Gayon und Dupetit mit ihrer Asparagin-Ammoncitrat-Nitratnährlösung muß also geschlossen werden, daß unter allen bisher untersuchten Umständen bei der Denitrifikation neben freiem Stickstoff Stickoxydul entsteht. Im allgemeinen wird die Bildung des Stickoxyduls stark gefördert durch hohe Nitratkonzentration und auch relativ hohe Temperaturen scheinen diesen Vorgang stets zu begünstigen. Diese beiden Umstände sind eben für die Entwicklung des denitrifizierenden Sporenbildners (Bacillus nitroxus) sehr günstig und gleichfalls, wenn auch in geringerem Maße, für B. pyocyaneus, welcher ebenfalls zu den kräftigsten Stickoxydulbildnern gehört. Sind die genannten Bedingungen nicht realisiert, so erzeugen

auch diese Bakterien mehr freien Stickstoff. Bacillus Stutzeri tut letzteres unter allen Umständen.

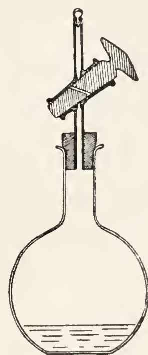
Im Anfang unserer Untersuchung hatten wir den Eindruck, daß eine langsame Gasbildung bei übrigens günstigen Entwicklungsbedingungen stets auf die Entstehung von relativ viel Oxydul hinweist, doch haben wir später für diese Regel mehrere Ausnahmen gefunden.

Es steht fest, daß die Oxydulbildung auch in der Natur regelmäßig stattfinden muß; eine der Ursachen, wodurch die direkte Beobachtung davon erschwert wird, werden wir im folgenden Kapitel betrachten.

Kapitel 2. Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien.

1. Verbrauch in Rohkulturen.

Die großen Unregelmäßigkeiten, welche vom Anfang unserer Versuche an bei der Stickoxydulbildung beobachtet wurden, veranlaßten, die Frage zu stellen, ob dieses Gas vielleicht von den Erzeugern selbst würde verbraucht werden können. Auf sehr einfache Weise konnten wir nachweisen, daß dieses tatsächlich der Fall ist, und zwar nicht allein durch rohe Bakterienanhäufungen, sondern auch durch bestimmte Arten in Reinkultur. Der von uns schließlich für diese Versuche verwendete Apparat besteht aus einem Kochkolben von 200 ccm Inhalt, worin 50 ccm mit der Kalturflüssigkeit und 150 ccm mit stickoxydulhaltigem Gasgemisch angefüllt wurden. Der Kolben ist geschlossen mit Gummistöpsel und und Glashahn (Fig. 3), welch letzterer Füllung und Probeentnahme des Gases durch die Gasbürette gestattet. Die Füllung geschieht derweise, daß durch Kochen der Nährflüssigkeit und Abkühlung bei geschlossenem Hahn ein Vacuum erzeugt wird, welches nach Verbindung mit dem mit Stickoxydul angefüllten Gasometer sich mit diesem Gase vollsaugt. Die Infektion findet statt, indem in den Raum in der kleinen Glasröhre oberhalb des Hahnes steriles Wasser mit dem zu verwendenden Impfmaterial gebracht und der Hahn etwas geöffnet wird zur Schaffung nach innen.

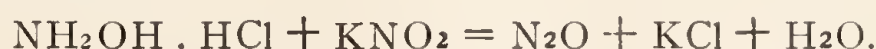


Figur 3.
Kolben mit Glashahn für Mikrobenkultur in Stickoxydulatmosphäre bei constantem Volum.

Wir verwendeten zuerst Stickoxydul, aus Ammonnitrat bereitet, von der Zusammensetzung:

N_2O	84,6 Proz.
N_2	9,4 Proz.
O_2	6,0 Proz.

Später beinahe reines N_2O, bereitet aus salzsaurem Hydroxylamin und Kaliumnitrit:

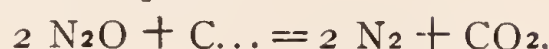


$$NH_2OH \cdot HCl + KNO_2 = N_2O + KCl + H_2O.$$

Das Gas wurde im Gasometer über gesättigter Chlorcalciumlösung aufbewahrt.

Das qualitative Kriterium für die Zerlegung des Stickoxyduls ist die Druckzunahme im Innern des Kolbens. Wird nämlich das Gas assimiliert, so entsteht

eine Kohlensäuremenge, welche dem Sauerstoff und eine Stickstoffmenge, welche dem Stickstoff des Oxyduls entspricht:



$$2\,N_2O + C\ldots = 2\,N_2 + CO_2,$$

so daß eine Volumzunahme von vier auf sechs, also auf $1^{1/2}$ zustande kommt. Bei den Rohkulturen ist der Stickoxydulverbrauch so beträchtlich und findet so schnell statt, daß die einfachste Versuchsanstellung schon überzeugend ist. Mit den meisten Reinkulturen müssen genauere Beobachtungen angestellt werden; nur B. Stutzeri zerlegt sehr kräftig.

Schon unsere ersten Versuche mit großen Kolben von 500 ccm und einem flüssigen Inhalt von 100 ccm gaben sofort positive und sehr überraschende Resultate.

Hier folgt die nähere Beschreibung einiger unserer Versuche.

Am 25. Mai wurde ein Erlenmeyerkolben von 500 ccm mit 100 ccm Fleischbouillon gefüllt, mit etwas Gartenerde infiziert und darein gebracht ca. 400 ccm eines Gases, welches 84,6 Proz. N_2O, 9,4 N_2 und 6 Proz. O_2 enthielt, und kultiviert bei 37^0 C.

Als am 27. Mai deutlich Überdruck bemerkbar war, wurde die erste Gasanalyse ausgeführt, wobei sich zeigte, daß der Stickoxydulgehalt auf 70 Proz. gesunken war.

Am 1. Juni wurden drei neue Gasanalysen ausgeführt mit 35, 30 und 26 ccm Gas, alles mit dem gleichen Resultate, daß das Gas zusammengesetzt war aus:

5 Proz. N_2O, 2 Proz. CO_2, 90 Proz. N_2 und kein Sauerstoff.

Beinahe alles Stickoxydul war also verschwunden.

Mikroskopisch waren nur sehr kleine Bakterien nachweisbar. Kulturell wurde neben vielen kleinen nicht denitrifizierenden auch B. pyocyaneus gefunden und eine verflüssigende fluoreszierende Form.

Interessanter sind die Versuche, wenn anstatt Bouillon einfachere Kulturflüssigkeiten verwendet werden.

Am 25. Mai wurden 500 ccm einer Kulturflüssigkeit von der Zusammensetzung: 100 Leitungswasser, 0,5 Asparagin, 0,05 K_2HPO_4 mit Erde infiziert, in einem Erlenmeyerkolben von 500 ccm eingebracht und der weitere Raum angefüllt mit dem oben genannten Gase, welches 84,6 Proz. N_2O enthielt und bei 37^0 kultiviert. Schon am 26. Mai war Druck bemerkbar und es wurden nur noch 3 Proz. N_2O bei der Gasanalyse gefunden.

Am 27. Mai wurde aus dieser Kultur ein Tropfen übergeimpft in eine identische Kulturflüssigkeit und bei 37^0 kultiviert. Am 1. Juni zeigte die Gasanalyse in 40 ccm kein N_2O mehr, dagegen 17 Proz. CO_2, 83 Proz. N_2 und keinen Sauerstoff. Es wurde daraus am 29. Mai aufs neue unter identischen Bedingungen übergeimpft und kultiviert. Das Gas am 1. Juni, also einer jungen Kultur, hatte die Zusammensetzung: Kein N_2O, 13 Proz. CO_2 und 87 Proz. N_2. Die Kulturflüssigkeit war strotzend mit kleinen Bakterien erfüllt, welche bei der Kultur meistenteils als B. Stutzeri, ferner als B. pyocyaneus und vereinzelte andere Arten erkannt wurden.

Hierdurch war also erwiesen, daß der Hauptsache nach denitrifizierende Bakterien das Stickoxydul gespalten hatten, und daß sie den Sauerstoff desselben ebensogut für die Verbrennung des Asparagins hätten verwenden können, wie denjenigen des Nitrats.

Weil der Stickstoff natürlich in der Flüssigkeit aus dem gelösten Stickoxydul frei gemacht wird, kann man in solchen Kulturen beim Schütteln des Kolbens, trotz des darin herrschenden Druckes, Gasentwicklung sehen.

Weil uns dieser Versuch wichtig erschien, haben wir denselben in unserem kleinen Kulturapparat (Fig. 3) von 200 ccm mit 50 ccm der gleichen Nährlösung und 150 ccm Gas von der Zusammensetzung 77,6 Proz. N_2O, 8 Proz. Sauerstoff und 14,4 Proz. N_2 bei 37^0, aber ohne jede Infektion, wiederholt. Der Versuch begann am 29. Mai, am 5. Juni hatte das Gas genau die gleiche Zusammenstellung behalten und Bakterienwachstum war nicht eingetreten.

Wir haben noch drei weitere Versuche ausgeführt mit einer Kulturflüssigkeit von folgender Zusammenstellung: Leitungswasser, 1 Proz. Calciummalat, 0,05 Proz. Chlorammon, 0,05 Proz. K_2HPO_4, infiziert mit Erde, kultiviert bei 37^0 im Apparat Fig. 3.

In einem am 25. Mai begonnenen Versuche war am 27. Mai alles N_2O verschwunden. In einem anderen am 27. Mai begonnenen Versuche war eine identische Nährlösung, jedoch als Impfmaterial ein Tropfen der vorgehenden Kultur verwendet, und hieraus wurde am 29. wieder ein Tropfen unter identischen Bedingungen übergeimpft.

Das Gas im letzteren Versuche ergab bei der Analyse 3 Proz. N_2O, 33 Proz. CO_2, 64 Proz. N_2, kein Sauerstoff. Auch hier war also das Stickoxydul beinahe verbraucht. Die bakteriologische Untersuchung bei Aussaat auf Bouillonagar und Bouillongelatine lieferte viel B. pyocyaneus und stark wachsende Kolonien einer nicht verflüssigenden Art in sehr großer Menge.

Wenn man bei der Beurteilung dieser Resultate bedenkt, daß Asparagin ohne Sauerstoffquelle eine sehr schlechte Bakteriennahrung darstellt, so ist durch das vorgehende erwiesen, daß Stickoxydul eine ebenso gute Quelle für Oxydationssauerstoff wie die Nitrate ist.

2. Verbrauch von Stickoxydul durch Reinkulturen.

Weil wir durch die vorgehenden Versuche sichergestellt hatten, daß gewisse Denitrifikatoren, wie B. Stutzery und B. pyocyaneus, sich durch Stickoxydul in Asparagin- und Malatlösungen ebensogut anhäufen lassen, wie durch Nitrate, lag es auf der Hand, zu erwarten, daß eben diese Arten auch in den Reinkulturen das Oxydul zerlegen würden.

Um dieses definitiv zu erweisen, folgen hier die Resultate zweier Versuche mit zwei Varietäten von B. Stutzeri und von einem mit B. pyocyaneus: In allen Fällen war die Kulturflüssigkeit wieder Leitungswasser, 0,5 Proz. Asparagin- 0,5 Proz. K_2HPO_4, wovon 50 ccm in unseren kleinen Kulturapparat (Fig. 3) gebracht wurde mit 150 ccm Stickoxydul aus Ammonnitrat bereitet von der Zusammensetzung: 77,6 Proz. N_2O, 8 Proz. O_2 und 14,4 Proz. N_2. Es wurde bei 37^0 kultiviert und ebenfalls am 29. Mai infiziert.

Beim ersten Versuche wurde geimpft mit einem alten Stamme von B. Stutzeri aus der Sammlung. Am 5. Juni bestanden 36 ccm des Gases aus 1,6 ccm oder 4,4 Proz. N_2O, 7 ccm oder 19,4 Proz. CO_2 und 27,4 odér 76,2 Proz. N_2, Sauerstoff fehlte. Es war also das gesamte Stickoxydul zerlegt und in freien Stickstoff verwandelt.

Bei einem anderen Versuche wurde geimpft mit einem neuen Stamm von B. Stutzeri, aus einer Asparagin-N_2O-Anhäufung isoliert. Am 5. Juni bestanden 42 ccm des Gases im Kölbchen aus 1 ccm oder 2,4 Proz. N_2O, 8 ccm oder 19 Proz. CO_2 und 33 ccm oder 78,6 Proz. N_2, Sauerstoff fehlte. Auch hier war also das N_2O verbraucht. Beide Kulturen waren mikroskopisch und kulturell rein geblieben.

Beim dritten Versuche fand die Infektion statt mit B. pyocyaneus. Der N_2O-Verbrauch war in diesem Falle viel langsamer wie mit B. Stutzeri, doch färbte sich die Kulturflüssigkeit nach mehreren Tagen blau durch Pyocyaninbildung. Am 5. Juni bestanden 47 ccm des Gases im Kölbchen aus 34 ccm oder 72½ Proz. N_2O, 1,4 ccm oder 3 Proz. CO_2, 7,8 ccm oder 17 Proz. N und 3,8 ccm oder 8 Proz. O_2, so daß merkwürdigerweise noch kein Sauerstoffverbrauch nachzuweisen war. Am 24. Juni bestanden 20 ccm des Gases aus 14 ccm oder 70 Proz. N_2O, 0,6 ccm oder 3 Proz. CO_2, 4,4 ccm oder 22 Proz. N_2 und 1 ccm oder 5 Proz. Sauerstoff, so daß letzteres Gas bis zum Ende des Versuchs nachweisbar blieb. Die Denitrifikation des Stickoxyduls durch B. pyocyaneus ist durch diesen Versuch jedoch erwiesen.

Wir haben die Versuche mit Reinkulturen wiederholt mit viel reinerem N_2O, welches aus salzsaurem Hydroxylamin und Kaliumnitrit bereitet war und aus 96 Proz. N_2O und 4 Proz. N_2 bestand.

Wir arbeiteten mit dem Kolben (Fig. 3) und mit der Kulturflüssigkeit: 50 ccm Leitungswasser, 1 Proz. Calciummalat, 0,02 Proz. $ClNH_4$, 0,02 Proz. K_2HPO_4 und 150 ccm N_2O, immer bei 37^0; alle Versuche begannen am 10. Juli.

Aus einem Kontrollversuch ohne Infektion ergab sich, daß die Zusammensetzung des Gases nach 9tägiger Brütung kaum verändert war: 20 ccm aus dem Apparat gesogen, ergaben 19 ccm oder 95 Proz. N_2O und 1 ccm oder 5 Proz. N_2.

In einem Versuche mit B. Stutzeri (isoliert aus Fleischbouillon-Ammonnitrat) stieg der Druck im Apparat in 9 Tagen derart, daß wir am 19. Juli 94 ccm durch Überdruck austreten lassen konnten. Hiervon hatten 50 ccm die Zusammenstellung:

N_2O	3 ccm oder	6 Proz.
N_2	34 „ „	68 „
CO_2 . . , ...	13 „ „	26 „

so daß nahezu 90 Proz. des Oxyduls in Stickstoff und Kohlensäure (zum Teil als Carbonat) verwandelt waren.

Mit B. pyocyaneus war das Resultat, daß 45 ccm durch Überdruck ausgeblasen werden konnten, wovon 25 ccm analysiert wurden und ergaben:

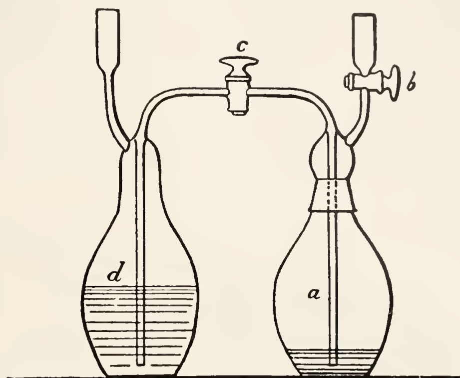
N_2O.	17 ccm oder	68 Proz.
N_2	5 „ „	20 „
CO_2	3 „ „	12 „

so daß hier wie bei dem früheren Versuch mit B. pyocyaneus, die Zerlegung zwar schwächer, jedoch ebenfalls unzweifelhaft war.

3. Kann Stickoxydul zugleich als Sauerstoff- und Stickstoffquelle verwendet werden?

Bei den vorgehenden Versuchen war stets neben dem Stickoxydul noch eine besondere Stickstoffquelle zur Verfügung, sei es als Chlorammon, als die Amid-

gruppe des Asparagins, oder als die stickstoffhaltigen Körper der Fleischbouillon. Um nun die hier gestellte Frage zu beantworten, haben wir den Apparat von Dr. Söhngen verwendet (Fig. 4)[1]). Der Kolben a wurde beschickt mit Leitungswasser, 1 Proz. Calciummalat, 0,05 Proz. K_2HPO_4 und weiter angefüllt mit dem mit etwas Luft verunreinigten Stickoxydul, wovon oben die Zusammensetzung gegeben ist. Der Kolben d erhielt das gleiche stickstofffreie Gemisch und stand mit der atmosphärischen Luft in Verbindung. Es wurde am 25. Mai infiziert mit Erde und bei 30^0 C kultiviert, weil wir eine Temperatur von 37^0 zu vermeiden wünschten, um im Kolben d Bindung des atmosphärischen Stickstoffs durch Azotobacter zu ermöglichen, wofür 37^0 zu hoch ist. Schon am 29. Mai war es klar, daß die Absorption des Oxyduls begonnen hatte, denn beim Öffnen des Hahnes c zeigte sich Überdruck. Am 4. Juni ergab die Gasanalyse folgendes: 4 Proz. N_2O, 25 Proz. CO_2 und 71 Proz. N_2 ohne Sauerstoff, so daß beinahe alles Stickoxydul verbraucht war. In diesem Kolben hatte sich eine dichte Spirillenkultur einer kleinen, Spirillum tenue ähnlichen Art entwickelt, welche nicht nur in der Tiefe, sondern auch als treibende Haut vorkam, vermischt mit vielen Sphaeriten von Calciumcarbonat. Dieses Resultat war besonders dadurch auffallend, daß im Kolben d, also in Berührung mit der Luft in Übereinstimmung mit der Erwartung, eine Azotobacterhaut entstanden war während im Kolben a diese Art vollständig fehlte. Das Stickoxydul hatte sich deshalb bezüglich Azotobacter wie eine Lösung eines Ammonsalzes oder eines Nitrates betragen und dessen Wachstum verhindert. Merkwürdig war es auch, daß eben in diesem Falle ein Spirillum erhalten war, welches als Denitrifikator den Stickstoff aus dem Oxydul frei gemacht hatte, während uns bei keinem andern Denitrifikationsversuch Spirillen begegnet sind.



Figur 4. Apparat von Dr. Söhngen für Mikrobenkultur in Gasatmosphäre bei konstantem Druck (c offen), oder bei konstantem Volum (c zu). Für Füllung mit oder Entnahme von Gas werden Gummischläuche mit Glasröhre in die erweiterten Teile der Tubulaturen geschoben: a Kulturkolben mit Gasatmosphäre; b, c Hähne; d Kolben mit Nährlösung und Luft.

Obschon wir hinzufügen müssen, daß eine Überimpfung der Spirillenkultur unter gleichen Bedingungen kein Spirillenwachstum ergeben hat, steht es fest, daß die an der Spitze dieses Paragraphen gestellte Frage zu bejahen ist für die bezeichnete Rohkultur.

---

[1]) Centralbl. f. Bakteriol. 2. Abt. Bd. 15. S. 513, 1905.

Daß auch B. Stutzeri in Reinkultur, wenn auch schwierig, N_2O als Stickstoffquelle verbrauchen kann, ergibt sich aus folgendem Versuche:

Als Kulturflüssigkeit kam wieder Leitungswasser, 1 Proz. Calciummalat, 0,2 Proz. Kaliumphosphat, mit Weglassung des Ammonsalzes in Verwendung. Die Kultur fand statt in dem Kolben Fig. 3 bei 30° vom 10. bis 19. Juli. Das verwendete Stickoxydul war das 96prozentige Gas aus Hydroxylamin. Der Überdruck war wieder gering; 25 ccm Gas, am 19. Juli ausgesogen ergaben:

1	ccm	oder	4	Proz.	CO_2
20	„	„	80	„	N_2O
4	„	„	16	„	N_2.

Es waren also nur 16 Proz. des N_2O verschwunden, doch ist die Zahl zu groß, um ein Versuchsfehler sein zu können.

4. Gibt es Stickoxydul zerlegende Bakterien, welche Nitrate nicht denitrifizieren können?

Die Frage muß für Nährlösungen mit und ohne eine andere Quelle gebundenen Stickstoffs wie das Oxydul, gesondert beantwortet werden. Der im vorigen § zuerst beschriebene Versuch scheint zu erweisen, daß das dabei gefundene Spirillum wohl das Oxydul und nicht Nitrate zu denitrifizieren vermag, und zwar bei Abwesenheit anderer Stickstoffverbindungen. Wir glauben das wenigstens ableiten zu müssen aus dem genannten Umstand, daß wir dasselbe niemals bei anderen Denitrifikationsversuchen gefunden haben.

Zur Beantwortung des zweiten Teiles der Frage haben wir unsere Calciummalat-Chlorammon-Kaliumphosphat-Lösung infiziert mit der Reinkultur einer Nitrat nicht denitrifizierenden Art, welche aus einer Calciummalat-N_2O-Kultur isoliert war In dem Kolben Fig. 3 war vom 10.—19. Juli bei 30° C nur geringer Überdruck vorhanden, zu schwach, um genügend Gas für die Analyse auszupressen. Darum wurden 30 ccm mit der Quecksilberbürette abgesogen und analysiert, sie ergaben:

4	ccm	oder	13,5	Proz.	CO_2
21	„	„	70	Proz.	N_2O
5	„	„	16,05	Proz.	N_2.

Hier mußte also sicher, wenn auch schwache Oxyduldenitrifikationen stattgefunden haben, und also auch Wachstum auf Kosten des Oxydulstickstoffs, trotzdem wir, wie gesagt, keine Denitrifikation von Nitrat mit dieser Bakterie bemerkt hatten.

5. Chemosynthese mit Stickoxydul als Energiequelle.

Das Wort »Chemosynthese« zur Bezeichnung der biochemischen Bildung von Kohlenstoffverbindungen durch Zerlegung von Kohlensäure vermittelst chemischer Energiequellen anstatt des Lichtes, also als Analogon des Wortes »Photosynthese«, ist von Pfeffer eingeführt [1]) und soll auch hier verwendet werden. Bei der großen Bedeutung dieses Gegenstandes, der sozusagen einen der Wege vorzeichnet,

[1]) Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Bd. 1. p. 346, 1897.

deren Verfolgung uns vielleicht zu tieferer Einsicht in das Problem der spontanen Generationen führen wird, erscheint es zweckmäßig, eine kurze Übersicht der bisher bekannten Vorgänge auf diesem Gebiete vorauszuschicken. Es handelt sich um die folgenden Prozesse:

Vorgang	Beobachter	Erreger
1. Luft-Wasserstoff- oder Knallgasoxydation	**T. de Saussure** 1839[1]) **M. Niklewski** 1907[2]) Wir	Kleine bewegliche Stäbchen, welche eine schleimige Haut auf der Nährlösung erzeugen (Bacillus Saussurei).
2. Ammon- und Nitritoxydation?	**Winogradsky** 1890[3])	Nitrosomonas und Nitrobacter.
3. Oxydation von Thiosulfat und Schwefelwasserstoff	**Natanssohn** 1902[4]) Wir	Kleine Stäbchen mit Spirillenbewegung (Thiobacillus thioparus),
4. Oxydation von Tetrathionat	Wir 1902	Wie vorgehend.
5. Denitrifikation mit Schwefel	Wir 1902[5])	Spirillenartige Kurzstäbchen (Thiobacillus denitrificans).
6. Denitrifikation mit Thiosulfat	Wir 1902	Erreger unbekannt.
7. Methanbildung aus Kohlensäure und Wasserstoff	**Söhngen**, Delft 1906[6])	Fermente der Methanbildung.
8. Oxydation des Schwefels durch Luft	**Jacobsen**, Delft 1908	Noch nicht beschriebene Beobachtungen.

Der zweite und wichtigste dieser Vorgänge muß noch mit einem Fragezeichen angedeutet werden, weil Winogradsky nicht bekannt war mit B. oligocarbophilus[7]), welche sich eben bei den Bedingungen der Nitrifikation kräftig entwickelt auf Kosten der organischen Kohlenstoffverbindungen der Laboratoriumsluft, was bei wochenlang andauernden Versuchen auch bei den Nitrit- und Nitratfermenten als möglich vorausgesetzt werden muß, weil es feststeht, daß kleine Quantitäten organischer Stoffe für diese Mikroben sehr förderlich sind.

Dennoch ist es wahrscheinlich, daß hier wirklich Chemosynthese stattfinden kann, jedoch nur allein aus Notbedarf, das heißt nur dann, wenn alle organischen Nahrungsstoffe fehlen. Das wäre gänzlich analog mit der Photosynthese bei Chlorella, Stichococcus, Pleurococcus, Chlamydomonas und anderen niederen Algen, welche im Lichte nur dann Kohlensäure zerlegen, wenn keine geeignete organische Nahrung erreichbar ist.

Bezüglich des ersten, dritten und vierten Vorganges läßt sich derselbe Einwand nicht erheben, denn sie verlaufen in wenigen Tagen, also viel zu schnell,

[1]) Mémoires de la Soc. de physique etc. de Génève. T. 8. 1839. p. 163.
[2]) Bulletin intern. de l'Acad. des sc. de Cracovie, Dec. 1906.
[3]) Annales de l'Institut Pasteur. T. 4 et 5. 1890, 1891.
[4]) Mitteilungen aus der Zool. Station zu Neapel. Bd. 15. 1902. Heft 4.
[5]) Phénomènes de réduction produits par les microbes. (Archives Néerland. T. 9. 1903. p. 131).
[6]) Ontstaan en verdwijnen van waterstof en Methaan etc. Dissert. Delft 1906.
[7]) Centralbl. f. Bakteriol. Abt. II. Bd. 10. 1903. p. 33.

als daß die Mikroben aus der winzigen organischen Kohlenstoffquelle der Atmosphäre schöpfen könnten, welche nur deshalb für B. oligocarbophilus (und vielleicht die Fermente der Nitrifikation) zureichend ist, weil deren Wachstum sehr langsam verläuft und erst nach Wochen beträchtlich wird. Überdies ist die Hinzufügung organischer Kohlenstoffquellen, wenigstens für die Vorgänge 3, 4, 5 und 6 bestimmt nachteilig.

Bei der Denitrifikation mit Schwefel Thiosulfat kann auch darum nur an Chemosynthese gedacht werden, weil der Verlauf davon in geschlossenem Raume stattfindet, wo nur minimale Luftblasen eindringen können[1]).

Der oben gegebenen Aufzählung der bisher bekannien Chemosynthesen können wir nun als neues Beispiel einen Vorgang zufügen, wobei als Energiequelle einerseits die Oxydation des Wasserstoffs, andererseits die exothermische Spaltung des Stickoxydes zugrunde liegt, nach der Formel:



$$N_2O + H_2 = H_2O + N_2.$$

Dieses entspricht einer Volumverminderung des ursprünglichen Gasgemisches bis auf die Hälfte, und der Verlauf der Reaktion ist deshalb festzustellen, wenn dieselbe in geschlossenem Raume stattfindet.

Wir verwendeten für den Versuch den Kulturapparat von Dr. Söhngen Fig. 4, worin die Füllung wie folgt stattfand: Der Kolben a war für die Kultur bestimmt und wurde anfangs gänzlich mit der Nährlösung

Leitungswasser	100
Bikaliumphosphat	0,02
Chlorammon	0,02
Natriumbicarbonat	0,1

beschickt, worin als Impfmaterial etwas Gartenerde aufgeschüttelt war. Im kurzen Röhrchen oberhalb b wurde dann am 28. Mai die Gaszuleitung aufgesetzt, die Hähne b und c geöffnet und 150 ccm N_2O + 150 ccm H_2 oberhalb der in a zurückbleibenden Flüssigkeit gelassen. Das verwendete Gas war beinahe gänzlich sauerstofffrei und enthielt nur 4 Proz. N . Die Kultur fand bei 30° C statt.

Schon nach 3 Tagen war eine Trübung in der Flüssigkeit entstanden und deutlich Druckverminderung in a bemerkbar, welche sich dadurch ablesen ließ, daß beim Öffnen des Hahnes c das Niveau bei a nach oben, bei d nach unten ging, und zwar, wie durch ein angebrachtes Merkzeichen angegeben wurde, wurden in jener Zeit ca. 150 ccm übergehebert, also ein so großes Volum, daß eine starke Absorption des Gases sichergestellt und gänzliches Verschwinden des Wasserstoffes wahrscheinlich war.

Auf der Oberfläche der Flüssigkeit in a hatten sich eine dünne, schleimige, treibende Haut gebildet, welche der unter ähnlichen Bedingungen entstehenden

---

[2]) Bezüglich der Denitrifikation mit Schwefel muß ich noch bemerken, daß dieser Vorgang oft schwierig einzuleiten ist. Man tut am besten, dafür ziemlich, aber nicht allzu fein zerteilten oder zermahlenen Schwefel zu verwenden (kein Sulfur precipitatum der Apotheken) und mit viel Grabenmoder zu infizieren. Einmal im Gange, handelt es sich jedoch dabei um einen sehr energischen Vorgang, wobei jedes kleinste Stückchen Schwefel in einen eng anschließenden Bakterienpanzer eingehüllt ist, welcher soviel organisches Material enthält, daß jeder Zweifel an Chemosynthese aus Kohlensäure ausgeschlossen ist. Im Gärungsgase wurde kein Stickoxydul gefunden.

Haut in Luft und Wasserstoff von Bacillus Saussurei zwar äußerlich ähnlich, mikroskopisch davon jedoch beträchtlich verschieden war. Hier handelt es sich nämlich um kleine, nicht bewegliche Kurzstäbchen, während die Saussureihaut größtenteils aus zwar unbewegten, jedoch beweglichen Stäbchen besteht, die sobald sie freikommen, fortschwimmen.

Aussaaten von der Stickoxydul-Wasserstoff-Bakterienhaut auf verdünnten Fleischbouillon-Agar haben die bezügliche Bakterie noch nicht geliefert, wahrscheinlich ist für deren Kultur ein ärmeres Nährsubstrat notwendig, als wie für B. Saussurei. Merkwürdigerweise entwickelten sich auf der Fleischbouillonplatte wie bei den Methanoxydationsversuchen von Dr. Söhngen[1]), mehrere Keime von B. pyocyaneus, welcher hier jedoch sicher nicht das primäre Agens der Oxydation, sondern ein sekundärer Symbiont war, welcher von den bei der Chemosynthese gebildeten organischen Körpern lebte.

Für die Gasanalyse wurden am 8. Juni 29 ccm herausgezogen. Diese enthielten keine Kohlensäure.

Für die Untersuchung auf Wasserstoff wurden 14 ccm mit der gleichen Luftmenge vermischt und sowohl der Explosion unterworfen, wie in der Drehschmidtschen Kapillare verbrannt, jedoch ohne daß dabei eine Volumverminderung bemerkbar war. Wasserstoff fehlte also gänzlich.

Es wurden nun wieder 14 ccm Gas herausgenommen, mit 14 ccm Wasserstoff vermischt und aufs neue in der Drehschmidtschen Kapillare verbrannt, ebenfalls ohne Kontraktion, so daß auch das Stickoxydul fehlte und also aus dem Kulturkolben gänzlich verschwunden und in Stickstoff verwandelt war.

In einem Kontrollekolben mit gleichem Inhalt, jedoch mit sterilisierter Erde versetzt, anstatt mit lebendem Impfmaterial, konnte keine Veränderung in dem Gaszustand gefunden werden, nachdem die Flüssigkeit sich mit Gas gesättigt hatte und dann wochenlang bei 30^0 aufbewahrt wurde.

Dieser Versuch war also vollständig überzeugend.

Wir haben dann in denselben Apparat eine neue, aus gleichen Teilen Wasserstoff und Stickoxydul bestehende Gasmenge zugelassen, und nach einigen Tagen wieder, wenn auch schwächere Kontraktionen beobachtet.

Inzwischen war die treibende Bakterienhaut nach unten gesunken, und ein damit eingeimpfter neuer Kolben hat zwar wieder unter gleichen Bedingungen die Zerlegung von $NO^2 + H^2$ gezeigt, nicht aber in gleichem Maße wie die Rohkultur, so daß die nähere Beschreibung des Versuches überflüssig erscheint, um so mehr weil die chemosynthetische Kohlensäurezerlegung vermittelst der Wasserstoffstickoxydulmethode durch obige Versuche, wie wir meinen, unzweifelhaft erwiesen ist.

Bevor wir diese Betrachtungen abschließen, sei noch darauf hingewiesen, daß wir bisher vergeblich versuchten, Methan mit Stickoxydul durch Mikroben zu zerlegen. Und ferner, daß wir glauben, daß Schwefel und Schwefelwasserstoff für die Chemosynthese mit N^2O, wenn auch schwieriger, sich auf ähnliche Weise eignen als wie für die obengenannten Chemosynthesen mit Luft und Nitraten. Jedenfalls war bei der Denitrifikation mit Schwefel kein N_2O, sondern allein CO

---

[1]) Versl. d. Kon. Akad. van Wetensch. Amsterdam. Dl. 14. 1905. p. 289.

und N_2 im Gärungsgase nachweisbar. Doch sind in dieser Beziehung unsere Versuche noch nicht beendet.

Zusammenfassung.

Fassen wir zunächst die Resultate zusammen, welche wir bezüglich der Stickoxydulbildung gefunden haben, so ergibt sich folgendes:

1) Abgesehen von der Chemosynthese mit Schwefel und Nitraten als Grundlage, kommt Denitrifikation mit alleiniger Stickstoffbildung, also ohne Stickoxydul, als selbständiger, jedoch vorübergehender, bei der Überimpfung mißlingender Prozeß nur vor unter dem Einfluß anaërober Granulobacter-Arten in Gärungen mit Kohlehydraten als Kohlenstoffquelle. Dabei entwickelt sich zugleich Wasserstoff und findet Ammonbildung aus einem Teile des Nitrates statt. Übrigens liefern die denitrifizierenden Mikroben bei allen anderen untersuchten Kulturbedingungen Stickoxydul neben freiem Stickstoff, wenn auch in stark wechselnden Verhältnissen.

2) Bouillon mit 5 bis 12 Proz. Nitraten gibt bei 20^0 bis 37^0 und mit Erde als Infektionsmaterial einen Gasstrom mit mehr als 80 Proz. N_2O, so daß ein glühender Span sich darin entzündet. Bei geringerem Nitratgehalt entsteht relativ weniger Oxydul und mehr freier Stickstoff. Der hauptsächlich dabei tätige Mikrobe ist der polymorphe Sporenbildner Bacillus nitroxus mit seinen Unterarten.

Auch im Boden dürfte Bacillus nitroxus der Hauptdenitrifikator sein.

3) Mit Reinkulturen von Bacillus pyocyaneus, kultiviert in Bouillon mit 1 Proz. Nitrat entsteht bei 37^0 ein Gärungsgas mit 65 bis 72 Proz. Stickoxydul.

Etwas ähnliches sagen Gayon und Dupetit bezüglich ihres Mikroben *a* (wohl B. pyocyaneus), wenn kultiviert in Ammoncitrat-Asparagin-Nitratlösung.

4) Bacillus Stutzeri, rein, liefert bei 37^0 in Bouillon mit 1 Proz. Ammonnitrat Gärungsgas mit 10 Proz. N_2O, in Bouillon mit 2 Proz. NH_4NO_3 Gas mit 20 Proz. N_2O.

5) Unser aus 1 Proz. Seignettesalz 1 Proz. Kaliumnitrat isolierter Micrococcus denitrificans lieferte bei 37^0 in Bouillon mit 1 Proz. NH_4NO_3 Gas mit 20 Proz. N_2O und 42 Proz. N_2.

6) Denitrifikation durch Sporenbildner ist in den Rohkulturen intensiver, wie in den Reinkulturen. Dieses kann nicht allein durch die Gegenwart der Symbionten erklärt werden, doch hängt es zusammen mit den Eigenschaften der Keime selbst, wahrscheinlich derweise, daß auf den aëroben Platten nur die schwächer denitrifizierenden Individuen zur Entwicklung gelangen.

7) Kleine Mengen von Stickoxydul müssen sowohl im Boden wie in der Atmosphäre gegenwärtig sein.

Die Versuche bezüglich des Verbrauches des Stickoxyduls haben folgendes ergeben:

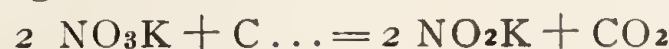
1) Besonders die denitrifizierenden Bakterien zerlegen bei günstigen Ernährungsbedingungen das Stickoxydul mit Leichtigkeit, wobei Stickstoff abgetrennt, der Sauerstoff zu Kohlensäure wird. Bacillus Stutzeri besitzt diese

Eigenschaft in starker Ausbildung, was die Hauptursache der geringen Stickoxydulbildung durch diese Art ist, und zugleich das gute Anhäufungsverfahren dafür erklärt, wenn anstatt Nitrat Stickoxydul verwendet wird.

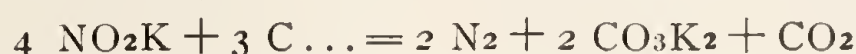
2) Stickoxydul kann für einige Bakterien, worunter ein Spirillum, als Sauerstoffquelle dienen und verhindert das Wachstum von Azotobacter.

3) Es gibt Bakterien, welche Nitrate nicht direkt denitrifizieren, wohl aber das durch andere Arten gebildete Stickoxydul zersetzen können.

4) Die bisherige Theorie des Denitrifikationsprozesses:

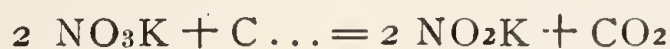


$$2\ NO_3K + C \ldots = 2\ NO_2K + CO_2$$



$$4\ NO_2K + 3\ C \ldots = 2\ N_2 + 2\ CO_3K_2 + CO_2$$

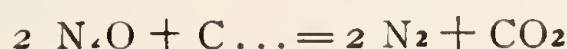
muß durch eine andere, innerlich wahrscheinlichere ersetzt, nämlich:



$$2\ NO_3K + C \ldots = 2\ NO_2K + CO_2$$

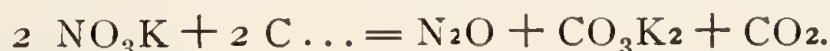


$$2\ NO_2K + C \ldots = N_2O + CO_3K_2$$



$$2\ N_2O + C \ldots = 2\ N_2 + CO_2$$

und zu gleicher Zeit mit folgendem Vorgange ergänzt werden:



$$2\ NO_3K + 2\ C \ldots = N_2O + CO_3K_2 + CO_2.$$

5) Zu den bekannten Chemosynthesen konnte als neu hinzugefügt werden die Kohlensäurezerlegung durch einen Mikroben, welcher seine Energie erhält, indem aus Wasserstoff und Stickoxydul bei Gegenwart von Chlorammon und Natriumbicarbonat Wasser erzeugt wird.

Tafelerklärung.

Die Vergrößerung ist überall 720mal. Die Aufnahme geschah mit Obj. Zeiß Apochromat 2,5 mm Wasserimmersion und Project. Ocular 2.

Fig. 1. Bacillus sphaerosporus. Kultur auf Fleischbouillongelatine, 3 Tage alt, lebend.

Fig. 2. Bacillus nitroxus. Kultur auf Fleischagar, 2 Tage alt, lebend.

Fig. 3. Bacillus nitroxus. Kultur auf Erbsenlaubagar, 2 Tage alt, lebend.

Fig. 4. Wie vorgehend, gefärbt mit Carbolfuchsin.

Fig. 5. Bacillus nitroxus. Kultur auf Erbsenlaubagar, 3 Tage alt, in Sporenbildung begriffen, lebend.

Fig. 6. Eine andere Stelle von vorgehendem Präparate, lebend aufgenommen.

Delft, im September 1909.



Fig. 1.

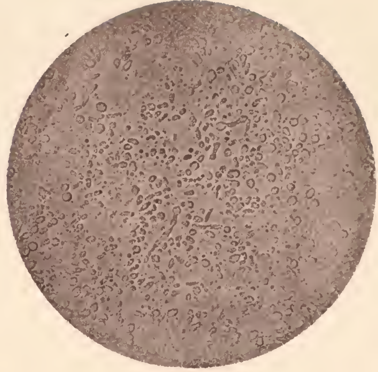


Fig. 2.



Fig. 3.

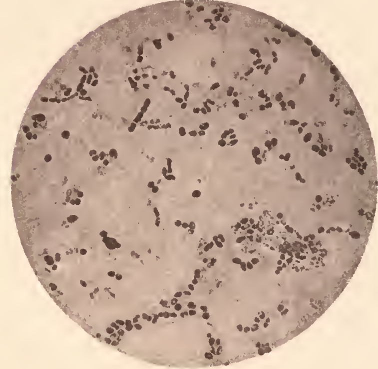


Fig. 4.

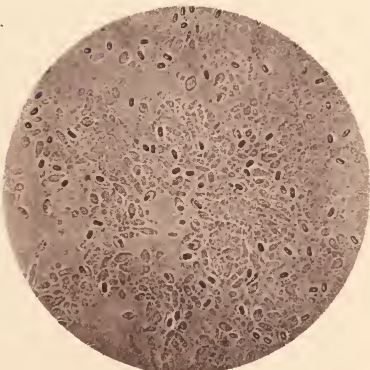


Fig. 5.



Fig. 6.

Fig. 1: *Bacillus sphaerosporius*. Fig. 2, 3, 4, 5 und 6: *Bacillus nitroxus*.